

**Contribution à l'étude
du pronostic fœtal
dans les grossesses
avec immunisation anti-rh
par dosage
de la bilirubine dans le liquide amniotique**

(Laboratoire de la clinique obstétricale de Lyon)

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 23 Juin 1964

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Bernard LAMOTTE

Ancien Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Né le 29 Mars 1937, à PONT-A-MOUSSON (Meurthe-et-Moselle)



LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

—
1964

**Contribution à l'étude
du pronostic fœtal
dans les grossesses
avec immunisation anti-rh
par dosage
de la bilirubine dans le liquide amniotique**
(Laboratoire de la clinique obstétricale de Lyon)

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 23 Juin 1964

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Bernard LAMOTTE

Ancien Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Né le 29 Mars 1937, à PONT-A-MOUSSON (Meurthe-et-Moselle)



LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

—
1964

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyens honoraires	M. J. LEPINE, Membre de l'Institut.
Doyen	M. H. HERMANN, Correspondant de l'Institut
Assesseurs	M. J.-F. CIER.
	MM. M. LEVRAT et L. REVOL.

Professeurs Honoraires : MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET.

PROFESSEURS

Clinique urologique	MM. CIBERT.	Clinique traumatologique des membres	MM. CREYSSEL.
Physique biologique	PONTHUS (dét. à Beyrourh).	Clinique carcinologique ..	DARGENT.
Clinique neuro-psychiatrique et hygiène mentale	DECHAUME.	Anatomie pathologique ..	GUICHARD.
Chimie organique et toxicologie	CHAMBON.	Pathologie générale et expérimentale	GIRARD Paul.
Clinique chirurgicale B ..	WERTHEIMER.	Anatomie	LATARJET.
Clinique médicale B	PAUPERT-RAVAULT.	Pathologie chirurgicale ..	PEYCELON.
Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires	FROMENT.	Thérapeutique	GIRARD Marcel.
Clinique médicale C	CROIZAT.	Pathologie médicale	VACHON.
Chimie biologique et médicale	ENSELME.	Physio-pathologie des voies respiratoires	GALY.
Clinique chirurgicale A ..	MALLET-GUY.	Radiologie	PAPILLON.
Pharmacie galénique	REVOL.	Clinique des maladies infectieuses	JEUNE.
Clinique gynécologique ..	POLLOSSON.	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale	GONIN.
Clinique obstétricale	PIGEAUD.	Bactériologie	MONNET.
Médecine du travail	BOURRET.	Physiologie et pathologie obstétricales	BANSSILLON.
Clinique médicale A	LEVRAT.	Physiologie B	CHATONNET.
Hygiène et action sanitaire et sociale	SOHIER.	Clinique endocrinologique.	GUINET.
Botanique et cryptogamie.	NETIEN.	Clinique de chirurgie orthopédique	TRILLAT.
Clinique chirurgicale C ..	BERTRAND.	Clinique stomatologique .	FREIDEL.
Chimie analytique pharmaceutique	BADINAND.	Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles .	MARION Joseph.
Pharmacie chimique et pharmacologie	DREVON.	Matière médicale et législation pharmaceutique .	DORCHE.
Médecine légale et déontologie	ROCHE.	Histologie et embryologie.	DUMONT Louis.
Parasitologie et pathologie exotique	COUDERT.	Chimie	PERROT.
Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio-phoniologie	MOUNIER-KUHN.	Physiologie A	CIER J.-F.
Clinique ophtalmologique .	PAUFIQUE.	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire.	PERRIN J.
Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie	THIERS.	Clinique de chirurgie cardiaque	MICHAUD Pierre.
Clinique de pneumo-phtisiologie	BRUN.	Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge	X...
		Biologie médicale et pharmacodynamie	X...

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appliquée à la médecine	MM. BERGER.
Bactériologie	BERTOYE.
Neuro-chirurgie	MANSUY.
Chimie pharmaceutique	COLLET.
Clinique de pédiatrie	SARROUY.
Climatologie	LACROIX.
Clinique chirurgicale propédeutique	LIARAS.
Neuro-chirurgie	LECUIRE.
Médecine générale	REVOL.
Thérapeutique chirurgicale	GOINARD.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Parasitologie	MM. ROMAN.
Pharmacie chimique et pharmacologie	CIER André.
Anatomie pathologique	FEROLDI.
Physique biologique	MORET.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

Chimie biologique	MM. CREYSSSEL Roger	Electro-radiologie	MM. BUFFARD.
Hygiène	THIVOLET.	Médecine générale et thé-	
Parasitologie	GARIN.	rapeutique	LEJEUNE.
Electro-radiologie	PINET.	Stomatologie	de MOURGUES
Botanique et cryptogamie.	ODDOUX.		F
Chimie analytique	de SOLLIERS.	Maladies infectieuses	NAUSSAC.
Médecine du travail	TOLOT.	Chirurgie générale	REBOUILLAT.
Médecine générale	DESPIERRES.	Pédiatrie	ROMAGNY.
Neuro-psychiatrie	GUYOTAT.	Médecine générale	DELAHAYE J.P.
Chirurgie générale	DESCOTES.	Anesthésiologie	DELEUZE R.
Pathologie expérimentale .	JOUVET.	Electroradiologie diagnostic	
Physique biologique	PEYRIN.	et thérapeutique	GIRAUD M.
Anatomie pathologique ..	TOMMASI.	Anesthésiologie	MICHEL.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

Anatomie	MM. DUROUX.	Biologie médicale et phar-	
Thérapeutique	BRETTE.	macodynamie	MM. FAUCON.
Anatomie	BOUCHET.	Physiologie	FLANDROIS.
Hématologie	FAVRE-GILLY.	Bactériologie	VIALIER-
Histologie et embryologie.	GIROD.		RAYNARD.
Chimie biologique	GRAS.	Médecine générale	FRIES.
Chimie analytique	MALLEIN.	Médecine générale	LAMBERT.
Hygiène	RIFFAT.	Chirurgie générale	MICHOULIER
		Pédiatrie	GILLY.

AGREGES EN EXERCICE

Obstétrique	MM. BURTHIAULT.	Chirurgie générale	MM. FRANCILLON.
Pédiatrie et puériculture .	FRANÇOIS.	Chirurgie générale	SAUBIER.
Oto-rhino-laryngologie . .	GIGNOUX.	Neuro-psychiatrie	SCHOTT.
Chirurgie générale	GUILLEMIN.	Neuro-chirurgie	ALLEGRE.
Chirurgie générale	JAUBERT.	Electro-radiologie	CHASSARD.
	DE-BEAUJEU.	Orthopédie	FAYSSE.
Chirurgie générale	MARION Pierre.	Oto-rhino-laryngologie . .	GAILLARD.
Médecine générale	PLAUCHU.	Médecine générale	GARDE.
Médecine générale	PONT.	Ophtalmologie	HUGONNIER.
Chirurgie générale	SAUTOT.	Pneumo-phtisiologie	KALB.
Médecine générale	TRAEGER.	Médecine générale	LARBRE.
Médecine générale	VIGNON.	Chirurgie générale	MARET.
Ophtalmologie	BONAMOUR.	Médecine générale	MORNEX.
Médecine légale	COLIN.	Médecine générale	NORMAND.
Dermatologie	COLOMB.	Médecine générale	PERRIN André
Chirurgie générale	de MOURGUES	Pédiatrie et puériculture .	BETHENOD.
	Georges.	Stomatologie	DUMAS.
Médecine générale	DEVIC.	Obstétrique	GARMIER.
Obstétrique	DUMONT	Médecine générale	NOEL.
	Martial.	Médecine générale	ROBERT.
Urologie	DURAND.	Orthopédie	SCHNEPP.

EXAMINATEURS DE LA THESE

Président : M. PIGEAUD ; Assesseurs : MM. MAGNIN, BURTHIAULT et NOTTER

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation.

A MA FEMME

A MES FILS

Je dédie ce travail.

A TOUS LES MIENS

Témoignage d'affection.

A TOUS MES AMIS

Témoignage de fidélité.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR HENRI PIGEAUD

Professeur de Clinique Obstétricale

Qui nous a fait le grand honneur de nous ouvrir les portes de la Clinique Obstétricale de Lyon, puis d'accepter la présidence du jury de cette thèse. Nous aimerions que ce travail, qu'il nous a confié, soit l'expression de notre profonde admiration et de notre respectueuse gratitude.

A NOS JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. MAGNIN

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ A. NOTTER

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ R. BURTHIAULT

Ils nous ont fait le grand honneur
d'accepter d'être nos juges.

Nous les prions de bien vouloir
agréer l'hommage de notre respec-
tueuse gratitude.

A MONSIEUR R. BETHOUX

Pharmacien Biologiste
Chef de Laboratoire à la Faculté

Qui nous a guidé au cours de ce travail avec une bienveillance constante qui nous a profondément touché. Nous le prions de bien vouloir agréer le témoignage de notre vive reconnaissance.

A MONSIEUR LE DOCTEUR J. REBOUL D'AUBIGNY

Assistant des Hôpitaux de Lyon

Qui n'a pas voulu montrer les limites de son habileté au cours de ces ponctions amniotiques. Qu'il trouve ici nos sincères remerciements.

A MADAME POLLIER ET A MADAME ARFI

En remerciement pour la part active qu'elles ont prise dans ce travail au Laboratoire de la Clinique Obstétricale.

A TOUS NOS MAÎTRES DE LA FACULTE DE MEDECINE
DE LYON

ET DE L'HOPITAL MILITAIRE D'INSTRUCTION
DESGENETTES

A MONSIEUR LE MÉDECIN-GÉNÉRAL-INSPECTEUR BORON

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce
Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes

A MONSIEUR LE MÉDECIN-COLONEL CAMELIN

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce
Médecin-Chef de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes

A MONSIEUR LE MÉDECIN-LIEUTENANT-COLONEL VITTORI

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce
Chef des services chirurgicaux
de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes

A MONSIEUR LE MÉDECIN-COMMANDANT FELIX

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce
Chef des services médicaux
de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes

Témoignage de respect et de reconnaissance.

PREMIERE PARTIE

L'ETUDE DU LIQUIDE AMNIOTIQUE PRELEVE PAR PONCTION TRANSABDOMINALE EN VUE D'ETABLIR LE PRONOSTIC DE L'ATTEINTE FŒTALE DANS LA GROSSESSE AVEC ISO-IMMUNISATION ANTI RH

Problème du pronostic de l'atteinte fœtale.

Si l'application rationnelle de la technique de l'exsanguiotransfusion permet depuis quelques années d'éviter, dans la plupart des cas, l'ictère nucléaire chez les enfants nés de mère immunisée contre le facteur RH, la mortalité périnatale de ces enfants reste encore très importante. Les statistiques récentes de Mayer et coll. (39) et de Goplerud (27) indiquent qu'elle reste supérieure à 30 pour 100 des enfants atteints. Pour y remédier, des essais thérapeutiques nombreux et divers ont été ou sont tentés mais certains ont abouti à l'échec, alors que les autres n'en sont encore qu'à la phase expérimentale. Le seul moyen dont dispose actuellement l'accoucheur est donc de déclencher artificiellement l'accouchement avant le terme, à un moment où l'enfant n'est encore que peu ou pas touché par la maladie hémolytique.

1° L'ACCOCHEMENT PRÉMATURÉ PROVOQUÉ, INTÉRÊT, RÉSERVES

L'intérêt de l'accouchement prématuré provoqué a été très largement exposé par une abondante littérature. Mais, dans le même temps, certains auteurs ont exprimé des réserves.

Il est bien certain, tout d'abord, que l'accouchement prématuré provoqué ne peut remédier aux accidents survenant avant la 32^e semaine de la gestation. Par ailleurs, son caractère antiphysiologique, quel que soit le mode de déclenchement (Ocytociques, Pose de bougie ou de ballon, Rupture artificielle des membranes, voire césarienne), peut correspondre pour le fœtus à un traumatisme, entraînant une anoxie chez un enfant déjà hypoxique du fait de la maladie hémolytique. Ce danger est d'autant plus grand qu'on est plus éloigné du terme et donc que le fœtus est plus vulnérable et la réponse utérine plus rétive, obligeant parfois à répéter les interventions.

De plus, l'immaturation enzymatique, et plus particulièrement la carence en glycuronyl-transférase presque totale chez le prématuré, empêchant la conjugaison, donc la détoxication et l'élimination de la Bilirubine, entraîne une hyperbilirubinémie, en un temps où, par ailleurs, l'imperméabilité de la barrière hémocérébrale est encore mal assurée. Il en résulte une aggravation du risque d'ictère nucléaire. Enfin la lutte antimicrobienne et la diététique sont loin d'être sans problème chez le prématuré.

En fait, il est très difficile d'apprécier exactement le danger d'autant que les enfants sur lesquels on intervient le plus tôt sont en général aussi ceux qui étaient les plus atteints par le processus hémolytique. Townsend (50), classant ses patientes d'après le degré d'atteinte des enfants précédents et l'apparition plus ou moins précoce du taux préjugé dangereux à la sérologie, estime que, dans l'ensemble, les résultats sont favorables à l'induction du travail. Dique et Wrench (21) font état d'une mortalité de 13,86 pour 100 si l'accouchement est réalisé à plus de 22 jours du terme, et de 8,8 pour 100 s'il est réalisé à moins de 22 jours du terme. Ces taux sont donc très inférieurs aux taux de mortalité en cas d'abstention.

Quoi qu'il en soit, le choix de la date à laquelle il convient de déclencher l'accouchement revêt une importance toute particulière, l'intervention, si elle est trop pré-

coce, constituant, en elle-même et par suite de l'immaturation du fœtus, un risque parfois plus important que celui qu'aurait fait courir la maladie hémolytique ; par contre, en intervenant trop tardivement, on laisse évoluer la maladie hémolytique, qui peut aboutir à la mort du fœtus in utero.

C'est pourquoi notre Maître le Professeur Pigeaud s'est fixé pour règle d'intervenir seulement, mais alors d'intervenir toujours, quand est établie la presque certitude que l'enfant pèse plus de 2.500 grammes (46).

2° ÉLÉMENTS CLASSIQUES DE PRONOSTIC.

Ceci étant établi, il reste à prouver l'existence d'une maladie hémolytique, et à en apprécier la gravité. On dispose pour cela de :

a) *L'anamnèse.*

On recherche :

- l'homo ou l'hétérozygotisme du père ;
- le degré d'atteinte des enfants antérieurs.

On sait, en effet, que le premier enfant n'est en général pas atteint, hormis les cas où l'immunisation est le résultat d'une transfusion malencontreuse, cas qui sont actuellement de plus en plus rares, mais qui correspondent souvent à des atteintes sévères. Par ailleurs, l'atteinte devient en règle générale de plus en plus grave au fur et à mesure des grossesses.

Mais on sait aussi que ces éléments sont très loin d'être absolus.

b) *L'évolution clinique de la grossesse.*

Hydramnios, arrêt du développement, cessation des mouvements fœtaux, anomalie des bruits du cœur, etc..., sont évidemment des éléments très péjoratifs, que l'on

peut compléter par la radiographie fœtale. Mais on ne peut attendre l'apparition de tels signes pour porter un pronostic. Ils sont en effet les témoins, souvent très tardifs, d'une atteinte grave du fœtus, anasarque, voire mort in utero.

c) Etude des taux d'agglutinines dans le sang maternel.

On admet généralement qu'un taux d'agglutinines élevé correspond presque toujours à une atteinte sévère, surtout quand une augmentation de ce taux a pu être enregistrée au cours de la grossesse en cause. Mayer et coll. (39), et Tovey et Valaes (49) précisent que l'on ne risque la mort du fœtus in utero que si le taux d'agglutinines est supérieur à :

— 1/40 chez la primipare ;

— 1/10 chez la multipare.

Mais on peut remarquer tout d'abord que ces chiffres peuvent varier de façon appréciable suivant qu'un même sang est examiné par un laboratoire ou par un autre. De plus, ces taux peuvent subir des variations produites par la grossesse elle-même, indépendamment de toute nouvelle immunisation. Enfin, citons, entre autres, les observations de Krieger (33) d'enfants peu touchés, voire RH négatifs, alors que la mère présentait un taux d'agglutinines élevé, séquelle d'une grossesse antérieure, où l'immunisation avait été intense. En l'absence d'une élévation flagrante du taux des agglutinines au cours de la grossesse que l'on suit, il est le plus souvent impossible de déterminer si l'immunisation est due à cette grossesse ou à une grossesse antérieure.

**

Les éléments classiques, anamnestiques, cliniques et sérologiques, ne permettent pas, parfois, d'apprécier avec exactitude la gravité de la maladie hémolytique,

et du risque que court l'enfant. Or, le déclenchement prématuré de l'accouchement, seule méthode prophylactique actuellement possible, comporte des risques non négligeables. Il paraît donc indispensable, avant d'en poser l'indication, de rechercher des sources d'information nouvelles sur l'état de l'enfant.

LA PONCTION AMNIOTIQUE

Dans cette recherche de nouveaux éléments d'information sur l'état du fœtus, il n'est pas étonnant que certains auteurs se soient tournés vers l'étude du liquide amniotique: Le fœtus y baigne, y rejette ses excréments. De plus, de nombreux échanges s'opèrent au niveau du cordon ombilical entre le sang fœtal et le liquide amniotique. On peut donc concevoir que celui-ci puisse donner un reflet fidèle de la vie du fœtus.

1° TECHNIQUE DE PRÉLÈVEMENT.

Diverses voies d'abord sont possibles: tout d'abord il est très facile de recueillir du liquide amniotique au moment de la rupture spontanée ou artificielle des membranes. Mais ces liquides amniotiques d'accouchement nous ont presque toujours fourni des résultats aberrants, du fait, sans doute, de souillures impossibles à éviter, par du sang maternel, du méconium, ou du vernix caseosa. On peut aussi recueillir le liquide amniotique par ponction vaginale, mais seulement au voisinage immédiat du terme, en sorte que cette méthode, comme la précédente d'ailleurs, ne permet jamais le pronostic précoce qui est précisément recherché.

C'est donc par voie transabdominale qu'il faut prélever le liquide amniotique. Pour cela, il convient tout d'abord de bien repérer la position du fœtus, par les moyens habituels, complétés, le plus souvent, par l'examen radiographique. On pique du côté des petites parties fœtales, diamétralement opposé au dos, en un point situé approximativement à égale distance entre l'ombilic et

l'épine iliaque antéro-supérieure. Après évacuation vésicale, la peau est soigneusement aseptisée et anesthésiée. L'aiguille employée est assez longue (8 cm), et son diamètre est de 12/10. On perçoit très bien le moment où, ayant traversé la paroi abdominale et la paroi utérine, on pénètre dans la cavité amniotique.

Les premiers centimètres cubes retirés ont parfois une teinte rosée due vraisemblablement à la présence d'un peu de sang maternel provenant de la paroi. En changeant alors de seringue, on peut, le plus souvent, prélever un liquide limpide, plus ou moins jaune, en quantité variable : 5 à 10 cc habituellement, plus quand on a, par ailleurs, le souci de soulager un hydramnios trop important.

La mère supporte toujours la ponction sans ressentir aucun trouble, et aucun pansement particulier n'est à faire au niveau de la ponction.

Il arrive cependant parfois que le liquide amniotique reste sanglant après le changement de seringue. Mayer et coll. (39) et Liley (34) signalent également cette possibilité. On peut dans ce cas repiquer 5 cm plus bas, mais il convient sans doute de ne pas persister si lors de cette seconde ponction le liquide amniotique demeure sanglant. Nous verrons au chapitre suivant quelle explication peut être donnée de ce phénomène.

Enfin, certaines ponctions demeurent blanches, quoi que l'on fasse. Pour Mayer (39), il s'agirait d'une obstruction de l'aiguille par du vernix caseosa, survenant surtout au voisinage du terme. Si la même difficulté a été rencontrée au cours des ponctions qui font l'objet de ce travail, on n'a pas pu établir une relation certaine entre cet incident et la proximité du terme.

En somme, si la technique est simple, il convient de ne pas en dissimuler la délicatesse de pratique. L'opérateur doit être entraîné, et sa prudence est sans doute le meilleur garant contre les accidents éventuels.

2° DANGERS DE LA PONCTION.

On peut en effet concevoir de nombreuses possibilités d'accident : si le danger d'infection de la cavité amniotique peut être évité par une aseptie rigoureuse, il reste le danger signalé, à vrai dire, dans un seul cas par Bévis (10), de provoquer l'accouchement, et surtout de piquer un placenta bas inséré, voire un cotylédon aberrant et de provoquer ainsi une hémorragie intra-amniotique, le plus souvent bénigne, mais pouvant parfois devenir dangereuse pour le fœtus. On peut penser que les liquides amniotiques sanglants que nous avons signalés plus haut, étaient dus à de telles ponctions trans-placentaires. Liley (34) et Mayer et coll. (39) signalent quelques accidents de cet ordre. Dans un cas où l'enfant put être extrait en bonnes conditions par une césarienne immédiate, Mayer put vérifier l'existence d'une lésion d'un vaisseau sous-amniotique.

Enfin, pour Moncrieff (43), la soustraction de liquide amniotique favoriserait le passage d'antigènes fœtaux dans la circulation maternelle et donc accentuerait le processus d'immunisation. Mayer et coll. (39), en réalisant des dosages d'agglutinines avant et après les ponctions, ont démontré que cela n'était pas à redouter.

En fait, au cours de l'expérimentation qui fait l'objet de ce travail, 57 ponctions transabdominales ont été réalisées sans qu'aucun accident n'ait été signalé. Que des auteurs très expérimentés aient eu à déplorer des accidents, certes rares, mais parfois graves, doit cependant faire considérer la ponction amniotique transabdominale comme un risque, mais, selon l'expression de Mayer, comme « un risque calculé, qui ne peut être mis en balance avec celui qu'entraînerait une attitude passive ».

3° INDICATIONS ET CALENDRIER DES PONCTIONS.

En raison de ce risque, on ne peut certainement pas considérer la ponction amniotique comme un geste de routine. Il convient d'en limiter les indications aux seuls cas où un doute subsiste quant à l'importance de l'atteinte fœtale. Liley (34) limite ses indications aux cas où une mort du fœtus in utero a été enregistrée dans les antécédents. Tovey et Valaes (49) aux cas dont le taux d'agglutinines dépasse les valeurs considérées comme dangereuses, mais nous avons vu qu'il y a parfois discordance entre ce taux et la gravité de la maladie hémolytique et que la loi de l'aggravation progressive de celle-ci au fur et à mesure des grossesses connaissait de nombreuses exceptions. Aussi faut-il penser, avec Mayer et coll. (39), que l'indication de la ponction amniotique doit s'appuyer sur un ensemble de constatations anamnestiques, cliniques et sérologiques qui font redouter un danger immédiat pour le fœtus.

Tous les auteurs considèrent que la date la plus favorable pour la ponction amniotique se situe entre la 32^e et la 35^e semaine. De plus, mis à part l'intérêt évident, sur le plan théorique, de connaître les variations du liquide amniotique, l'étude de celui-ci ne peut avoir d'intérêt pratique qu'au moment où se pose le problème de l'accouchement prématuré provoqué, c'est-à-dire, jamais avant la 32^e semaine.

Cependant, pour Walker (52), les liquides amniotiques prélevés après la 35^e semaine seraient souvent très difficiles à étudier, en raison, principalement, d'un trouble dû à la présence de vernix caseosa. Cette difficulté ne semble pas avoir été rencontrée par d'autres auteurs. Pour nous, nous avons signalé plus haut de nombreux déboires que nous avons eus avec des liquides d'accouchement. Indépendamment de ces cas, nous avons relevé 4 cas où le liquide amniotique, prélevé par ponction transabdominale, présentait un trouble plus ou moins important, per-

sistant après filtration et centrifugation, et conduisant à un résultat aberrant. Il s'agissait toujours de prélèvements effectués au-delà de la 35^e semaine. Il y a donc effectivement intérêt à effectuer la ponction avant la 35^e semaine, chaque fois que cela est possible.

Enfin, plusieurs auteurs ont estimé que des examens répétés du liquide amniotique étaient nécessaires. Pour Bévis (10), les ponctions doivent être répétées à intervalle maximum de 15 jours, de façon à enregistrer les variations de composition du liquide amniotique. Mayer et coll. (39) effectuent de même des ponctions répétées tous les 15 jours à partir de la 30^e semaine et Liley (34) effectue 2 à 3 prélèvements à 17 jours ou 3 semaines d'intervalle, à partir de la 28^e semaine.

Par contre, Mackay (36) se contente le plus souvent d'une seule ponction à la 35^e semaine, et ne la répète que s'il y a une trop grande divergence entre les résultats de l'examen du liquide amniotique et les données cliniques et sérologiques, ou s'il y a, après la ponction, une brusque augmentation du taux des agglutinines. Enfin, Walker (52), après avoir réalisé au début de son expérimentation, des ponctions répétées tous les 15 jours selon la technique de Bévis, estime ensuite qu'il suffit d'une seule ponction à la 32^e semaine.

En fait, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, la méthode d'étude du liquide amniotique proposée par ces auteurs est essentiellement qualitative. Il faut, dans ces conditions, que plusieurs résultats se recoupent pour pouvoir juger d'un cas. Dans notre expérimentation, où nous cherchons à mettre au point une technique quantitative, et à déterminer les taux normaux et pathologiques des pigments au moment où se pose le problème de l'accouchement prématuré provoqué, la majorité des ponctions a été pratiquée entre la 32^e et la 36^e semaine, avec quelques cas plus tardifs de femmes qui n'avaient pu être vues plus tôt, et quelques cas de ponctions répétées, essentiellement quand un hydramnios important imposait un prélèvement

de liquide amniotique à des fins thérapeutiques, et fournissait ainsi l'occasion d'un examen supplémentaire.

*
**

La ponction amniotique est une intervention simple mais délicate, et quelques rares accidents ayant été signalés par quelques auteurs, on doit en limiter les indications à des cas déterminés où elle apparaît comme le seul moyen d'établir un pronostic que refusent les données classiques.

L'ÉTUDE DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

1° HISTORIQUE.

L'étude du liquide amniotique a été menée par de nombreux auteurs dans des directions très diverses :

Baux et coll. (2 et 3) cherchent à établir le groupe sanguin fœtal par l'étude des globules rouges trouvés dans le liquide amniotique, de même que Freisleben (26). Mais Mayer et coll. (39), ayant repris cette étude, ne retrouvent ces globules rouges que dans 50 pour 100 des cas et, Liley (34), dans 10 pour 100. Encore l'interprétation est-elle rendue difficile par la présence conjointe de globules rouges maternels, sans doute entraînés, dans de nombreux cas, au moment de la ponction. De toute façon, le fait que l'enfant soit RH + ne permet jamais d'affirmer avec certitude l'existence d'une maladie hémolytique grave, mais seulement sa possibilité.

Beecham et coll. (4) étudient les variations de la leuco-aminopeptidase, enzyme dont l'activité serait liée au processus hémolytique, tandis que Wild (53) étudie la concentration en protides du liquide amniotique et définit des combinaisons entre protides et bilirubine, qui établissent l'origine fœtale de celle-ci. Mais cette étude n'apporte rien qui permette d'apprécier l'importance de l'atteinte fœtale par la maladie hémolytique.

C'est le mérite de Bévis (8, 9, 10) d'avoir montré la présence dans le liquide amniotique de divers sous-

produits de l'hémoglobine, résultant du processus d'hémo-lyse, et la relation existant entre ces substances et la maladie hémolytique du fœtus. Ces travaux furent repris par Walker (52), puis par Liley (34), Cary (16), Seelen (48), Mackay (36), Macbeth et Robertson (35), et en France par Mayer (38, 39).

2° ETUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU LIQUIDE AMNIOTIQUE.

Après avoir, en 1952 (8) et 1953 (9), montré les relations existant, d'une part entre le fer non hématique et l'anémie fœtale, d'autre part entre l'urobilinogène et l'ictère nucléaire, ces deux substances étant déterminées par microdosage, Bévis reprend, en 1956 (10), la méthode d'étude spectrophotométrique des solutions décrites par Mellon en 1950 et l'applique au liquide amniotique. Cette méthode consiste à mesurer l'absorption par une solution d'un faisceau de lumière monochromatique qui la traverse, en fonction de la longueur d'onde de cette lumière. Pour chaque valeur de la longueur d'onde, entre 320 $m\mu$ et 700 $m\mu$, on détermine ainsi la « Densité Optique » de la solution.

Si l'on porte, sur du papier millimétré, en abscisse les longueurs d'onde, et en ordonnée les densités optiques, on obtient, pour un liquide pur, une courbe exponentielle, que l'on peut, comme le fit Bévis, transformer en une droite, en portant les densités optiques (en ordonnée) sur une échelle logarithmique. A propos de certains liquides amniotiques, on constate sur cette droite un certain nombre d'accidents, en forme de pics plus ou moins élevés correspondant aux longueurs d'onde d'absorption maximum de différentes substances contenues dans ces liquides. En procédant par comparaison avec des solutions artificielles, on peut donc identifier les substances contenues dans les liquides amniotiques.

Bévis identifie ainsi :

- Un pic correspondant à de la Methémoglobine et au vernix caseosa ;
- Un pic correspondant à de l'Oxyhémoglobine ;
- Un pic correspondant à de la Bilirubine, .

et remarque que ce pic de Bilirubine est toujours trouvé dans les cas de maladie hémolytique du nouveau-né, d'autant plus élevé que la maladie est plus grave, ce pic étant par contre inexistant quand l'enfant est indemne.

Pour Mayer (39) et Liley (34), il y a intérêt à utiliser une représentation non logarithmique de la densité optique. Nous avons effectivement constaté, dès le début de notre expérimentation, que cette représentation faisait mieux ressortir les divers accidents de la courbe. Pour la même raison, il convient de mesurer les densités optiques pour un éventail assez large de longueurs d'onde, en opérant les mesures de 5 en 5 $m\mu$.

Nous donnons (fig. 1) deux exemples de courbes établies de cette manière. La courbe en pointillé correspond à un cas de fœtus non atteint par la maladie hémolytique. La courbe en trait plein correspond à un cas de maladie hémolytique sévère. On y aperçoit deux pics, relativement très élevés, l'un vers 415 $m\mu$, correspondant à l'Oxyhémoglobine, l'autre vers 460 $m\mu$, correspondant à la Bilirubine.

Mackay (36), ayant classé les courbes en 6 catégories, de 0 à V, suivant l'importance croissante du pic de Bilirubine, constate :

— Que dans les catégories 0, I et II, il n'y a jamais eu de mort du fœtus in utero, et que les catégories III et IV en comprennent quelques cas ;

— Que les catégories 0 à III correspondent à des cas où il est impossible de prévoir si l'enfant sera RH + ou RH — ;

— Que dans la catégorie V, tous les enfants sont morts in utero.

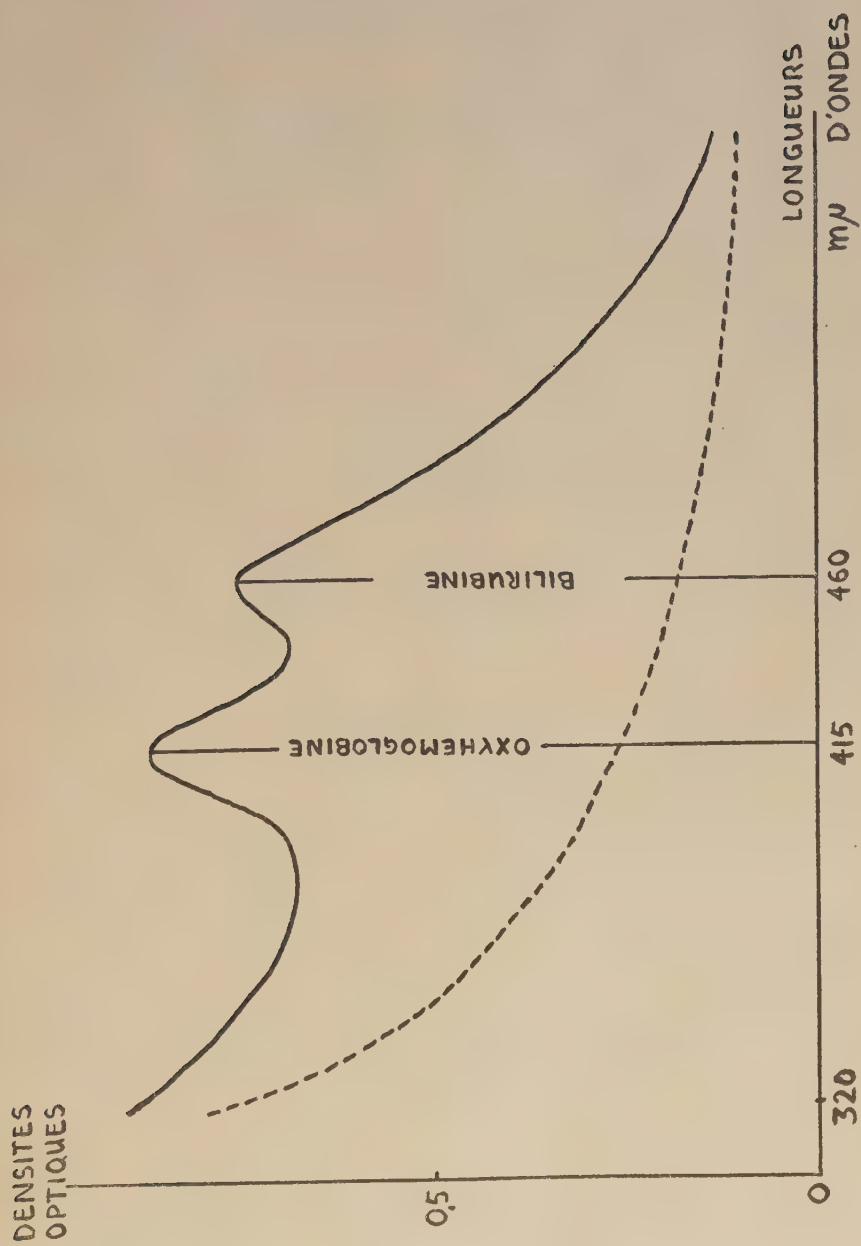


FIG. 1

Cela conduit cet auteur à énoncer les règles thérapeutiques suivantes :

— Pour la catégorie V, l'accouchement prématuré provoqué doit être accompli à la 33^e semaine ;

— Pour les catégories IV et III, entre la 33^e et la 37^e semaine ;

— Pour la catégorie II, on peut attendre la 37^e semaine, et on n'interviendra d'ailleurs que si le taux d'agglutinines de sang maternel est supérieur à 1/256.

Mayer et coll. (39) classent les courbes en 5 catégories en se basant sur les critères suivantes :

— Cat. I : Absence de tout pic de Bilirubine, la courbe présentant dans cette région une concavité dirigée vers le haut ;

— Cat. II : Segment de courbe rectiligne dans cette zone ;

— Cat. III : Légère convexité vers le haut dans cette zone ;

— Cat. IV : Dôme très net (exemple : fig. 1) ;

— Cat. V : Pic très élevé.

En classant par ailleurs les cas en 5 catégories suivant l'importance des signes cliniques et biologiques présentés par l'enfant, il constate une concordance très nette entre les catégories de courbes et les catégories de cas, d'où les règles thérapeutiques suivantes :

— Cat. I et II : Enfants peu ou pas touchés pour lesquels l'accouchement prématuré provoqué n'est pas à envisager, et qui n'auront pas besoin d'être traités immédiatement à la naissance.

— Cat. III : Enfants atteints de maladie hémolytique plus ou moins grave, mais ne risquant guère de succomber avant le terme. On peut donc laisser évoluer la grossesse pour ne déclencher l'accouchement qu'au voisinage

du terme, et si les conditions obstétricales se prêtent à l'intervention ;

— Cat. IV : Danger de mort fœtale au cours du dernier mois d'où la nécessité du déclenchement prématuré à la 35^e ou 36^e semaine ;

— Cat. V : Atteinte très grave, la mort fœtale risquant fort de se produire avant la fin du 8^e mois. Dans ce cas, l'interruption précoce de la grossesse, entre la 32^e et la 34^e semaine peut se justifier, malgré les énormes dangers qu'elle représente.

Par ailleurs, Bévis (10) s'étant préoccupé de la signification du pic de vernix caseosa et de Méthémoglobine, a constaté que ce pic ne se trouve que dans des cas de mort du fœtus in utero. Mayer et coll. (39) contestent cette signification pathologique. Pour nous, nous n'avons jamais retrouvé ce pic, même dans les cas de mort du fœtus in utero que nous avons eu à étudier.

Quant au pic de l'Oxyhémoglobine, il aurait également, pour Bévis, la valeur d'un témoin de l'hémolyse fœtale.

Mackay (36) conteste cependant cette interprétation et pense que cette Oxyhémoglobine provient essentiellement d'une effraction vasculaire au moment de la ponction, surtout si le placenta est en position antérieure, et l'on pourrait aussi parfois invoquer la préexistence d'une hémorragie rétro-placentaire. La nature de cette hémoglobine, maternelle ou fœtale, pourrait sans doute être déterminée, soit par des épreuves de résistance aux alcalies, soit par migration électrophorétique, mais nous n'avons pas connaissance de travaux dans ce sens.

3^o ESSAIS DE DOSAGE.

Mais, dans toutes ces méthodes, l'interprétation est basée uniquement sur la morphologie des courbes. Mackay

(36) et Mayer et coll. (39) insistent sur la nécessité de ne pas tenir compte de la valeur absolue de la hauteur des pics, bien que Bévis (10) ait tenté de le faire en utilisant une échelle préparée d'après une solution-type. En effet, la proximité du pic de l'Oxyhémoglobine de celui de la Bilirubine produit une interférence entre ces deux pics qui peuvent ainsi se surélever mutuellement. Il faut également tenir compte de la présence toujours possible de pigments voisins.

Il en résulte une imprécision dans l'interprétation des courbes que l'on est parfois fort gêné pour classer dans les catégories III, IV ou V.

Des essais de micro-dosage ont été réalisés, notamment par la méthode de Diazo-Réaction, mais ils aboutissent à des valeurs normales variant de 0,24 mg pour 1000 pour Beecham et coll. (4) et 1 mg pour 1000 pour Mayer et coll. (39). Ces variations paraissent explicables quand on connaît les causes d'erreurs auxquelles se heurte le dosage de la Bilirubine sanguine portant sur des taux faibles.

*
**

De nombreux auteurs ont démontré l'intérêt de l'étude de la Bilirubine dans le liquide amniotique, mais il n'existe pas de méthode de dosage simple et sûre de cette Bilirubine.

DEUXIEME PARTIE

DOSAGE DE LA BILIRUBINE DANS LE LIQUIDE AMNIOTIQUE

Historique.

1° NOTION DE BILIRUBINE LIBRE ET CONJUGUÉE.

La Bilirubine fut découverte dans le sérum par Gilbert, Herscher et Posternack et les premiers essais de dosage furent entrepris par Fiessinger et Walter (24) et par Meulengracht (42). Il s'agissait d'une colorimétrie directe de la teinte jaune du sérum par comparaison avec divers témoins.

Puis, Van den Bergh et Snapper (11) proposaient une réaction colorée plus sensible, mais uniquement qualitative, la Diazo-réaction, consistant en la formation d'azoïque entre la Bilirubine et l'acide sulfanilique diazoté (Réactif de Erlisch). Cette réaction permettait alors à Van den Bergh et Muller (12) de distinguer deux types de bilirubine :

— La Bilirubine directe, donnant une réaction directe ;

— La Bilirubine indirecte, ne donnant une réaction qu'après addition d'alcool. Ces deux types de Bilirubines correspondaient également à deux types de Sérums :

— La Bilirubine directe, aux sérums de sujets présentant un ictère par rétention ;

— La Bilirubine indirecte, aux sérums de sujets présentant un ictère de type hémolytique.

La nature de ces deux pigments fut très discutée mais on admet actuellement la conception de Billing et coll. (13) selon qui existent :

— La Bilirubine indirecte, qui est une Bilirubine libre insoluble dans l'eau au pH ordinaire ;

— La Bilirubine directe, conjuguée à l'Acide Glycuronique, d'où sa solubilité dans l'eau, et correspondant elle-même à deux pigments :

— Monoglycuronide ou Pigment I ;

— Diglycuronide ou Pigment II.

Dans un souci de commodité et de plus grande précision du langage, on adopte généralement pour convention, avec Fauvert et Benhamou (23), de ne considérer que :

— La Bilirubine Libre (ancienne Bilirubine Indirecte) et

— La Bilirubine Conjuguée (ancienne Bilirubine Directe).

2° MÉTHODES DE DOSAGE.

a) *Dosage par Diazo-Réaction.*

A partir de la Diazo-Réaction, à l'origine essentiellement qualitative, des méthodes de dosage furent proposées par Van der Bergh lui-même, puis par de nombreux auteurs. Elles consistent en l'appréciation colorimétrique de l'intensité de la réaction par comparaison :

— soit avec des témoins empiriques (Solutions de sels de Cobalt) ;

— soit avec des solutions artificielles de Bilirubine purifiée, ce qui permet de supprimer les unités empiriques.

— Il faut citer en particulier la méthode chromatographique de Billing (14) par passage sur Kieselguhr et dosage

colorimétrique ; et la méthode spectrophotométrique de Jouvenceaux et Revol (31).

Cependant ces méthodes de dosage se heurtent à certains écueils : Il convient tout d'abord d'éviter la précipitation des protéines sériques au cours de la réaction. Divers artifices ont été proposés pour cela : Malloy et Evelyn conseillent la forte dilution du sérum dans l'eau (37), Jouvenceaux et Revol (31), Brukner (15), Hsia et coll. (29), Fog (25) et Jendrassik (30) utilisent des mélanges tampons divers. La reproductibilité des résultats reste cependant mauvaise car la réaction colorée est par elle-même instable et augmente dans le temps. Il en résulte des évaluations très différentes de la réaction suivant la durée après laquelle elle est lue : 30 minutes pour Demange et coll. (20), Klaskin et Drill (32) et Malloy et Evelyn (37), 1 minute pour Ducci et Watson (22), 30 secondes pour Jouvenceaux et Revol (31). La détermination du taux de Bilirubine est donc faussée, et cela est d'autant plus sensible que le taux est plus faible, comme dans le liquide amniotique. Cette méthode est donc inapplicable ici (Mayer, 39).

b) *Dosage par oxydation.*

Citons ici les travaux de Monnet (44), portant sur l'oxydation de la Bilirubine en Biliverdine et permettant le dosage séparé de la Bilirubine Libre, stable en présence des oxydants mais instable à la lumière, et de la Bilirubine Conjuguée, instable en présence des oxydants, mais à peu près stable à la lumière.

c) *Dosages basés sur le pouvoir absorbant de la Bilirubine.*

Nous avons déjà cité les méthodes de colorimétrie directe du sérum. Shinowara ayant proposé l'étude spectrophotométrique du sérum, cette méthode fut reprise par Mertz et West (41), Childers et Barger (18) et par Delcourt

(19). Contrairement à la méthode de dosage par Diazo-Réaction, cette méthode s'applique très bien aux solutions très diluées. Elle est d'autre part très simple et très rapide, obligeant à des manipulations minimum. C'est pourquoi elle fut appliquée par Mathieu-Daudé (40) à l'étude du taux de la Bilirubine sérique des enfants atteints de maladie hémolytique, et au liquide amniotique par Bévis (10) et par la plupart des autres auteurs. C'est cette méthode également que nous nous sommes proposé d'appliquer.

DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DIRECT

1° ETALONNAGE DE L'APPAREIL.

Nous avons rappelé plus haut les principes généraux de la spectrophotométrie. A chaque substance correspond une longueur d'onde pour laquelle l'absorption de la lumière est maximum. Nous savons par ailleurs (Loi de Beer et Camber), que, pour une longueur d'onde donnée, la densité optique d'une solution, « d », peut s'exprimer par la relation :

$$d = K.C$$

« C » étant la concentration de cette solution ;

« K » étant un coefficient appelé coefficient d'extinction spécifique, dépendant :

— de l'épaisseur de la lame liquidienne, soit, pour l'appareil Jobin et Yvon que nous utilisons, l'épaisseur des cuves, égale à 1 cm ;

— de la substance étudiée ;

— de la longueur d'onde pour laquelle cette substance est étudiée.

Cette expression peut être représentée par une droite, « d » étant portée en ordonnée et « C » étant portée en abscisse, droite dont « K » est la pente.

Cette droite représentant les valeurs de la concentration de la substance étudiée en fonction de la densité optique, on peut donc, en mesurant la densité optique d'une solution de Bilirubine (liquide amniotique par exemple), pour la longueur d'onde d'absorption maximum de

la Bilirubine, connaître en se rapportant à cette droite la concentration en Bilirubine de cette solution.

En pratique, pour construire cette droite, il faut préparer des solutions de Bilirubine de diverses concentrations, et mesurer leur densité optique. Nous nous sommes heurté là à deux difficultés :

En effet, nous avons vu que le pic correspondant à la Bilirubine dans le liquide amniotique se situe, de même que dans le sérum, à la longueur d'onde de $460\text{ m}\mu$. Or, les solutions-témoins de Bilirubine qui sont habituellement préparées, par dissolution du pigment dans l'eau distillée additionnée de soude $0,1\text{ N}$, indispensable à la parfaite dissolution, donnent, quand on les étudie au spectrophotomètre, un pic dont le maximum est situé à $435\text{ m}\mu$. Nous avons retrouvé là, très exactement, les résultats de Heilmeyer (28) et de Mathieu-Daudé (40).

Par ailleurs, en réalisant des solutions-témoins par la méthode classique, et en les étudiant à $435\text{ m}\mu$, nous nous sommes aperçu que le coefficient d'extinction spécifique qui ressortait de nos mesures était presque le double de celui qui ressortait des mesures de Mathieu-Daudé. Cette différence ne peut évidemment pas être couverte par les erreurs de mesures qui ne doivent pas excéder 5 pour 100.

Cependant, en reprenant nos mesures avec des Bilirubines de marques différentes, nous avons constaté des variations pouvant aller jusqu'à 15 pour 100. De plus ces résultats peuvent varier considérablement suivant les conditions des expériences. Il est, en effet, souvent très difficile de reconstituer des solutions parfaitement limpides. D'autre part, la Bilirubine purifiée est très sensible à la lumière, et s'oxyde très vite. Pour éviter cette altération, il convient d'opérer très rapidement, de telle sorte qu'il ne s'écoule jamais plus de quelques minutes entre le moment où la Bilirubine est mise en solution, et le moment où s'effectue la lecture. Par ailleurs, certains auteurs ont proposé de protéger le pigment par du sérum. On sait, en effet, que la Bilirubine, Libre ou Conjugée,

est toujours liée à de la Sérums-Albumine (With, 54). Ainsi Jouvenceaux et Revol (31) ont-ils proposé une solution étalon constitué par une solution de Bilirubinate de Sodium additionnée de sérum, la soude en excès étant neutralisée par une solution à 7 pour 100 d'Acide Chlorhydrique. Mais, pour Monnet (45), la soude détermine très vite un trouble dans le sérum, et, de plus, il y a une destruction plus ou moins importante du pigment au cours de la préparation, en particulier par l'Acide Chlorhydrique. Chabrol (17), propose une solution de Bilirubinate de Sodium étendue par du sérum dans la proportion de 4 volumes de sérum pour un volume de solution aqueuse. Mais d'une part le pH de cette solution reste voisin de 9, d'autre part Monnet signale l'apparition fréquente d'une coloration brun-vert traduisant un début d'oxydation du pigment. Monnet propose donc une technique inspirée de celle de Barac (1) : la Bilirubine étant dissoute dans la soude à 0,1 N, est diluée avec de la Sérums-Albumine à 5 pour 100 dans un mélange tampon à $\text{pH} = 7,31$, constitué par du phosphate monosodique. Ainsi se trouve réalisée une solution parfaitement limpide, à pH très voisin de celui du sérum, et avec une quantité de Sérums-Albumine suffisante, pour fixer la totalité du pigment, puisque, pour Barac, 1 g de Sérums-Albumine peut complexer 21 mg de Bilirubine.

Nous avons repris cette méthode et constaté la très bonne reproductibilité des résultats, et la stabilité des solutions obtenues. De plus, pour ces solutions, on constate que le maximum du pic de la Bilirubine se situe entre 455 et 460 $\text{m}\mu$, comme dans le liquide amniotique ou le sérum. On peut penser qu'il s'est produit un complexe Sérums-Albumine-Bilirubine, dont les caractéristiques spectrophotométriques sont très voisines de celles du complexe physiologique.

Signalons qu'au cours de notre expérimentation, nous avons eu connaissance d'un nouveau produit, l'Icto-Trol, constitué par un complexe Bilirubine-Albumine lyophilisé.

La reconstitution est particulièrement facile, puisqu'il suffit de dissoudre le produit dans 8 ml de soluté de chlorure de sodium à 9 g/l pour obtenir une solution parfaitement limpide, titrant 52 mg/l de Bilirubine. Cette solution présente exactement les caractéristiques spectrophotométriques de la Bilirubine du liquide amniotique, avec maximum d'absorption à 455 m μ .

Ainsi, il ressort de nos mesures une valeur moyenne du coefficient d'extinction spécifique :

$$K = 0,0725$$

2° APPLICATION AU LIQUIDE AMNIOTIQUE.

Cependant, quand on cherche à appliquer ce résultat au liquide amniotique, on retrouve la difficulté déjà signalée par Mayer (39), et qui avait conduit cet auteur à s'interdire toute interprétation de la hauteur des pics : dans de nombreux cas, en effet, on trouve, conjointement au pic de bilirubine, un pic dont le maximum est situé à 415 m μ correspondant à de l'oxyhémoglobine. Nous avons vu que l'on ne pouvait attacher à la présence de ce pic une signification pathologique tant que l'on n'avait pas déterminé si cette hémoglobine avait une origine fœtale, auquel cas elle pourrait être un témoin de l'hémolyse, ou une origine maternelle, auquel cas elle ne serait que la conséquence d'un incident de la ponction, qui aurait ramené un peu de sang prélevé au passage dans la paroi, voire un peu de sang placentaire.

Quoi qu'il en soit, le voisinage de ces deux pics a pour conséquence qu'ils se surélèvent mutuellement en sorte que pour la longueur d'onde de 460 m μ , il est impossible de déterminer avec exactitude quelle est la part qui revient à la bilirubine et celle de l'oxyhémoglobine dans la densité optique.

On peut pourtant résoudre cette difficulté par l'artifice suivant :

— Soit une solution où la concentration

— en Bilirubine est C_B ;

— en Oxyhémoglobine et C_H .

— Soit d_1 la densité optique pour $460\text{ m}\mu$.

— Cette densité optique résulte de l'absorption

— due à la bilirubine, soit B_1 ;

— due à l'oxyhémoglobine, soit H_1 .

$$d_1 = B_1 + H_1 \quad (1)$$

— Soit K_{B_1} le coefficient d'absorption spécifique de la bilirubine pour cette longueur d'onde.

Nous avons :

$$B_1 = K_{B_1} \cdot C \quad (2)$$

— Nous pouvons déterminer de même, pour cette longueur d'onde, un coefficient d'absorption spécifique de l'oxyhémoglobine K_{H_1} , et nous avons :

$$H_1 = K_{H_1} \cdot C \quad (3)$$

— Soit d_2 la densité optique pour $415\text{m}\mu$.

— De même, cette densité optique résulte de l'absorption :

— due à la bilirubine, soit B_2 ,

— due à l'oxyhémoglobine, soit H_2 .

$$d_2 = B_2 + H_2 \quad (4)$$

— Nous pouvons de même définir, pour cette longueur d'onde, des coefficients d'extinction spécifiques :

— K_{B_2} pour la bilirubine,

— K_{H_2} pour l'oxyhémoglobine.

d'où nous tirons :

$$B_2 = K_{B_2} \cdot C \quad (5)$$

$$H_2 = K_{H_2} \cdot C \quad (6)$$

— En faisant le rapport entre les expressions (2) et (5), nous avons :

$$\frac{B_2}{B_1} = \frac{K_{H_2}}{K_{H_1}} = Q_B$$

Q_B étant donc constant, d'où nous tirons :

$$B_2 = Q_B \cdot B_1 \quad (7)$$

De même, le rapport entre les expressions (3) et (6) donne :

$$\frac{H_1}{H_2} = \frac{K_{H_1}}{K_{H_2}} = Q_H = \text{Constante}$$

d'où nous tirons :

$$H_1 = Q_H \cdot H_2 \quad (8)$$

— Si l'on porte dans l'expression (7) la valeur de H_1 donnée par l'expression (8), on obtient :

$$d_1 = B_1 + Q_H \cdot H_2 \quad (9)$$

Or, en portant dans l'expression (4) la valeur de B_2 déterminée par l'expression (7), on obtient :

$$d_2 = Q_B \cdot B_1 + H_2 \text{ ou } H_2 = d_2 - Q_B \cdot B_1$$

et en portant cette valeur dans l'expression (9), on obtient :

$$d_1 = B_1 + Q_H (d_2 - Q_B \cdot B_1)$$

d'où l'on tire :

$$B_1 = \frac{d_1 - Q_H \cdot d_2}{1 - Q_B - Q_H} = 0.$$

avec comme condition de possibilité de cette expression :

$$1 - Q_B \cdot Q_H \neq 0.$$

Nous avons exposé plus haut comment avait été déterminé le coefficient K_{B1} d'extinction spécifique de la Bilirubine pour la longueur d'onde de $455 \text{ m}\mu$:

$$K_{B1} = 0,0725$$

Nous avons mesuré de la même manière le coefficient d'extinction spécifique de la Bilirubine pour $415 \text{ m}\mu$:

$$K_{B2} = 0,0515$$

donc :

$$Q_B = \frac{K_{B2}}{K_{B1}} = \frac{0,0515}{0,0725} = 0,71$$

De même, on peut, à partir de solutions d'oxyhémoglobine de concentrations variables, dresser les droites donnant les densités optiques en fonction des concentrations, pour les longueurs d'onde 455 et $415 \text{ m}\mu$, et en tirer :

$$K_{H1} = 0,0012$$

et

$$K_{H2} = 0,0085$$

donc :

$$Q_H = \frac{K_{H1}}{K_{H2}} = \frac{0,0012}{0,0085} = 0,14$$

La formule donnée plus haut devient ainsi :

$$B_1 = \frac{d_1 - 0,14d_2}{0,90}$$

Par cette formule, on peut, connaissant la densité optique d'une solution comprenant conjointement de la bilirubine et de l'oxyhémoglobine, liquide amniotique par exem-

ple, pour les longueurs d'onde 455 et 415 $m\mu$, connaître la densité optique B_1 correspondante à la bilirubine, pour 455 $m\mu$. Si l'on reporte alors cette valeur de la densité optique sur la droite donnant les concentrations de bilirubine en fonction de la densité optique, dont l'équation est, nous l'avons vu :

$$d = 0,0725 C \text{ (C étant exprimé en mg/1)}$$

on peut déterminer la concentration en bilirubine de cette solution.

3° CRITIQUE.

Cependant, nous avons raisonné là sur des solutions qui par définition ne comprenaient que de la bilirubine et de l'oxyhémoglobine. Il en est ainsi de certains liquides amniotiques, mais on ne peut nier l'existence, dans d'autres, de plusieurs autres pigments. Nous avons vu que Bévis (48) signalait en fait l'existence de méthémoglobine, à laquelle, d'ailleurs, il attachait une signification hautement pathologique, et de vernix caseosa.

Nous avons signalé plus haut 4 cas de liquides amniotiques recueillis au-delà de la 35^e semaine et qui nous avaient donné des résultats aberrants. En effet, dans ces cas les courbes d'examen direct au spectrophotomètre (Densité optique en fonction de la longueur d'onde), se trouvaient relevées dans leur ensemble, sans que pourtant on n'y aperçoive les accidents caractéristiques de la Bilirubine ou de l'Oxyhémoglobine. Il s'agissait d'ailleurs de cas peu ou non pathologiques. Cette élévation globale peut être interprétée comme le résultat de la présence d'un trouble dû, pour Walker (52), à du vernix caseosa. Elle rend de telles courbes tout à fait ininterprétables quantitativement.

Nous avons d'ailleurs vérifié, par quelques essais systématiques, que plusieurs substances pouvaient venir troubler nos résultats : La Carboxyhémoglobine, par exemple,

donne deux pics situés à 540 et 575 $m\mu$, tandis que le méconium ou la Biliverdine donnent un pic qui se surajoute à celui de l'Oxyhémoglobine. Enfin, nous avons constaté, comme Walker, qu'un retard plus ou moins prolongé de l'examen du liquide amniotique au spectrophotomètre pouvait faire apparaître dans celui-ci des pics aberrants correspondant sans doute aux produits de destruction des divers pigments.

**

Si donc la méthode que nous avons proposée peut s'appliquer à des solutions ne comportant que de l'Oxyhémoglobine et de la Bilirubine, et à certains liquides amniotiques présentant les mêmes caractéristiques, elle reste très approximative en ce qui concerne la plupart des liquides amniotiques où la présence conjointe d'autres pigments peut venir troubler les résultats.

EXTRACTION PAR LES SOLVANTS ORGANIQUES

Pour pallier cet inconvénient, il faut pouvoir extraire du liquide amniotique toute la Bilirubine (mais seulement la Bilirubine) par un solvant quelconque et réaliser ainsi, dans ce solvant, des solutions pures que l'on pourra étudier au spectrophotomètre. Ce solvant doit répondre aux conditions suivantes :

- Etre un solvant organique, condition nécessaire à l'extraction de la Bilirubine libre, insoluble dans l'eau ;

- Etre un solvant polaire, condition nécessaire à l'extraction de la Bilirubine conjuguée (qui par l'effet de la glucuronconjugaison est soluble dans l'eau et dans les solvants polaires) ;

- Etre non miscible à l'eau afin qu'après l'extraction on puisse rejeter le résidu du liquide amniotique et effectuer une mesure sur un milieu débarrassé de toutes les impuretés (la séparation des deux phases étant effectuée par centrifugation).

L'utilisation du Chloroforme est proposée par Valera et coll. (51) qui extraient ainsi 80 pour 100 de la Bilirubine non conjuguée. Rivoire (47), puis Bénard et coll. (5) proposent l'extraction par le Benzène. Un certain nombre de critiques ont cependant été adressées à cette méthode :

- Nécessité de conditions d'extraction bien définies (durée et protocole de l'agitation surtout) ;

- Extraction souvent incomplète ;

- Altération de la Bilirubine en produits mal connus ;

- Possibilité pour le Benzène d'entraîner d'autres pigments jaunes.

C'est pourquoi Benhamou et Besson (6), Besson et Fauvert (7), et Monnet (45) proposent d'appeler le résultat de cette mesure « Bilirubine Benzéno-Extractible » pour marquer l'ignorance des produits qui sont réellement entraînés par le Benzène.

Nous avons repris à ce propos les travaux de Mathieu-Daudé (40) et nous proposons ainsi deux types d'extraction :

a) *Extraction par le Benzène.*

L'extraction étant d'autant plus incomplète que la concentration Bilirubine est plus forte, on prend seulement 1 cc de la solution à extraire et on fait agir sur elle 3 cc de Benzène en présence d'acide trichloracétique, l'acidification du milieu permettant une meilleure solubilité de la Bilirubine dans les solvants organiques. On parvient, en agitant la préparation pendant 2 à 3 minutes, à extraire 75 pour cent de la Bilirubine, mais on peut, en pratiquant une seconde extraction sur le résidu, obtenir encore environ 20 pour 100 du pigment, c'est-à-dire, réaliser une extraction pratiquement complète.

Le dosage s'effectue par comparaison de la somme des densités optiques correspondantes aux deux extractions avec une courbe d'étalonnage préparée en extrayant dans les mêmes conditions des concentrations connues de Bilirubine. Les mesures sont effectuées pour une longueur d'onde correspondant à la longueur d'onde d'absorption maximum de la Bilirubine en solution benzénique, soit 455 m μ .

Au contraire de ce qui s'était passé pour les solutions aqueuses, nos résultats ont ici entièrement confirmé ceux de Mathieu-Daudé (40), aux erreurs d'expériences près. La valeur du coefficient d'extinction spécifique est :

$$K = 0,017$$

et la courbe d'étalonnage a donc pour équation :

$$d = 0,017 C \text{ (fig. 2)}$$

Nous avons vérifié par ailleurs l'absence d'extraction d'autres pigments par le Benzène, en particulier de Biliverdine, présente en grande quantité dans les liquides amniotiques artificiellement souillés par du méconium. Ces faits, en réfutant les critiques exprimées plus haut, permettent d'abandonner l'expression de « Bilirubine Benzéno-extractible ».

Cependant, le Benzène étant un solvant organique non polaire, ne peut extraire que la Bilirubine Libre.

b) *Extraction par l'Alcool Amylique.*

Pour extraire simultanément la Bilirubine Libre et la Bilirubine Conjuguée, c'est-à-dire la Bilirubine Totale, Mathieu-Daudé utilise le Butanol.

Comme pour le Benzène, l'extraction est mauvaise en pH basique, d'où la nécessité d'utiliser un mélange Butanol-Acide Acétique à 10 pour 100 pour obtenir un pH acide. Cependant, on rencontre une difficulté tenant à la miscibilité partielle du Butanol à l'eau, car lors de la séparation des deux phases, il subsiste dans le résidu une partie du Butanol ayant servi à l'extraction, sur laquelle ne peuvent donc pas porter les mesures.

C'est pourquoi M. Béthoux, qui a une grande pratique de l'Alcool Amylique qu'il utilise depuis longtemps pour ses dosages hormonaux, en particulier pour le dosage du Proegnandiol a pensé que ce solvant, qui, en raison de ses groupements polaires, présente, vis-à-vis de la Bilirubine, les mêmes propriétés que le Butanol (extraction de la Bilirubine Libre et de la Bilirubine Conjuguée), présentait en outre l'avantage de sa non miscibilité pratiquement parfaite à l'eau. Les pertes de solvant deviennent donc négligeables et l'on évite ainsi d'avoir à appliquer une correction, comme pour le Butanol.

Nous donnons (fig. 3) la courbe d'étalonnage que nous avons obtenue dans les mêmes conditions que pour le Benzène. Le coefficient d'extinction spécifique étant :

$$K = 0,0205$$

pour la longueur d'onde d'absorption maxima de la Bilirubine, soit 450 $m\mu$, l'équation de la courbe est, pour cette même longueur d'onde :

$$d = 0,0205 C$$

Cependant, de même que le Butanol, l'Alcool Amylique extrait l'Hémoglobine en même temps qu'il extrait la Bilirubine. Il en résulte, une courbe à deux pics analogue à celle de la fig. 1 :

— Un pic situé à 450 $m\mu$, correspond à la Bilirubine ;

— Un pic situé à 400 $m\mu$, correspond à l'Hémoglobine.

Il est donc nécessaire, comme nous l'avons fait pour les solutions aqueuses d'appliquer une formule de correction qui sera établie de la même manière, en effectuant pour des solutions-étalons de Bilirubine et d'Hémoglobine, des mesures aux longueurs d'onde des absorptions maximum de ces deux substances en solution dans l'Alcool Amylique, soit 400 et 450 $m\mu$. Nous obtenons ainsi :

$$Q_B = 0,596$$

$$Q_H = 0,087$$

d'où la formule :

$$D = \frac{d_1 - 0,09 d_2}{0,95}$$

Par ailleurs, nous avons vérifié, comme pour le Benzène l'absence d'extraction d'autres pigments et en particulier de Biliverdine.

**

Ainsi établie, cette méthode est un moyen assez exact de dosage de la Bilirubine dans le liquide amniotique. Elle permet, en outre :

— d'une part le dosage de la Bilirubine Libre (extraction benzénique) ;

— d'autre part le dosage de la Bilirubine Totale (extraction par l'Alcool Amylique), d'où on peut déduire, par différence, la Bilirubine Conjuguée.

Enfin, cette méthode est de réalisation très simple et l'analyse du liquide amniotique par une personne entraînée ne demande jamais plus d'une heure et demie.

METHODE GENERALE DE DOSAGE

1° FILTRATION ET CENTRIFUGATION DU LIQUIDE AMNIOTIQUE.

Cette opération doit parfois être répétée plusieurs fois. Précisons cependant que s'il est indispensable d'éliminer tout trouble, ce qui n'est pas toujours possible, pour un examen spectrophotométrique direct, la méthode que nous proposons offre précisément l'avantage de permettre l'examen de liquides amniotiques restés troubles après filtration et centrifugation, puisque les mesures se font sur les solvants, qui, eux, demeurent limpides.

2° EXTRACTION PAR LE BENZÈNE.

Dans un tube à essais :

- 1 cc du liquide amniotique ;
- 3 cc de Benzène ;
- Quelques gouttes de Chlorure de Baryum.

On agite vigoureusement pendant 2 à 3 minutes, puis on centrifuge pour séparer les deux phases :

— La phase supérieure, correspondant au Benzène ayant extrait environ 75 pour 100 de la Bilirubine Libre, sert à une première mesure des densités optiques de 5 $m\mu$ en 5 $m\mu$, de 445 à 465 $m\mu$.

— La phase inférieure, correspondant au résidu du liquide amniotique, est reprise pour une seconde extraction dans les mêmes conditions et on effectue une nouvelle mesure.

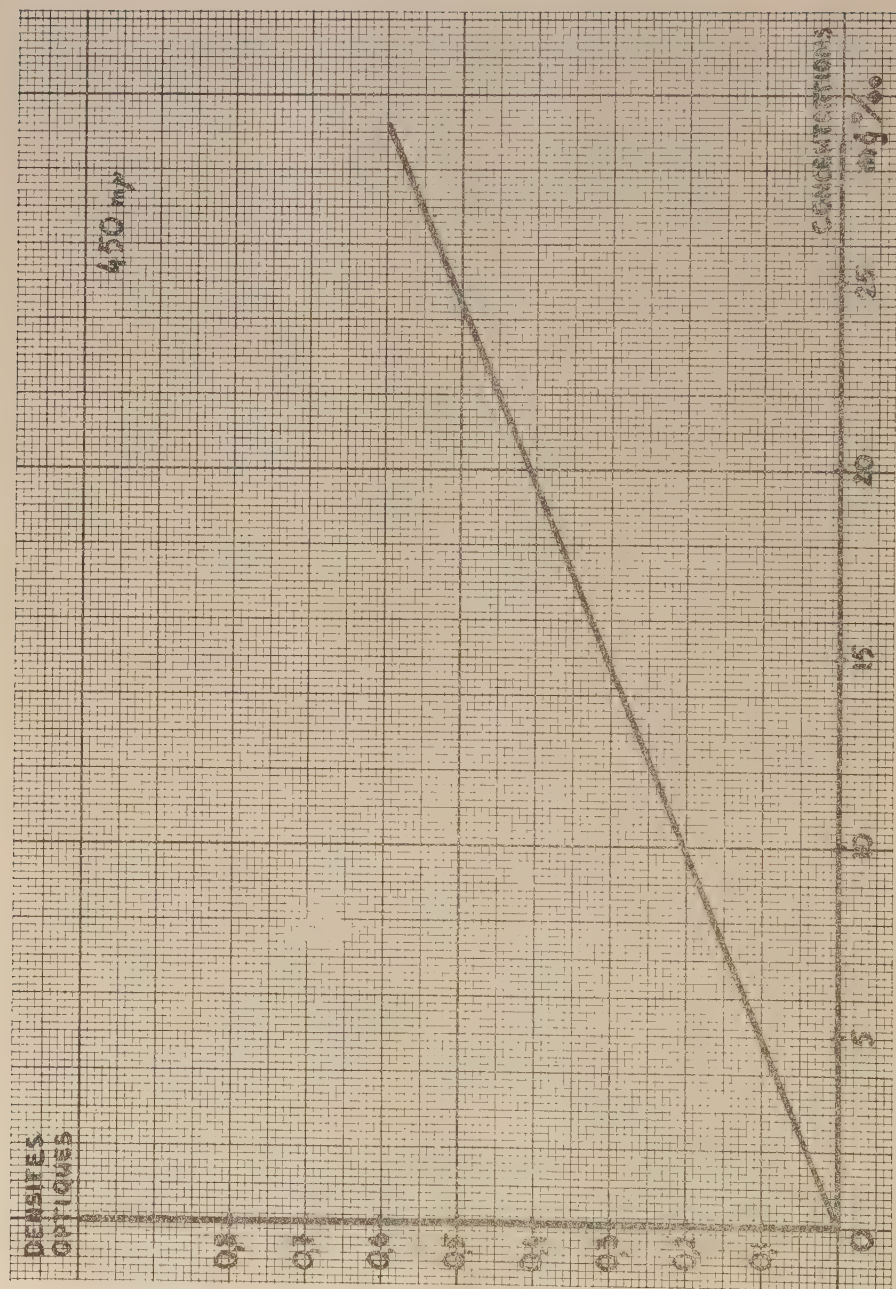


FIG. 2

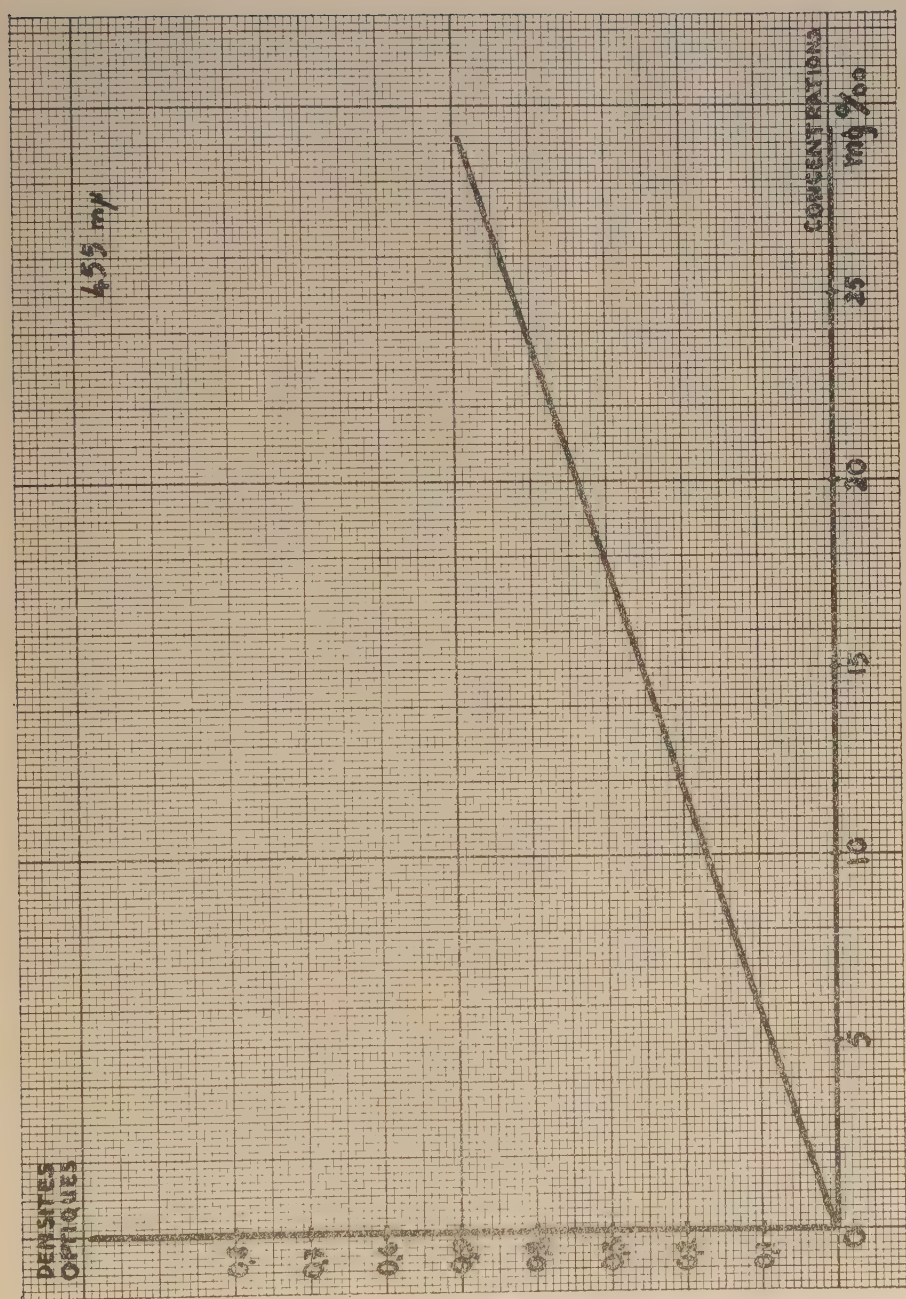


FIG. 3

On reporte sur la courbe d'étalonnage (fig. 2) la somme des densités optiques trouvées lors des deux mesures pour la longueur d'onde de $455\text{ m}\mu$. On déduit ainsi un chiffre correspondant au taux de Bilirubine Libre exprimé en mg pour 1000.

3° EXTRACTION PAR L'ALCOOL AMYLIQUE.

On procède exactement de la même manière, mais en remplaçant le Benzène par l'Alcool Isoamylique. On peut ici aussi réaliser une double extraction, mais la lecture des résultats s'effectue différemment :

— On détermine tout d'abord la densité optique pour la longueur d'onde de $450\text{ m}\mu$, soit d_1 , puis pour $400\text{ m}\mu$, soit d_2 , et on applique la formule :

$$D = \frac{d_1 - 0,09\ d_2}{0,95}$$

Cette valeur D est reportée sur la courbe d'étalonnage (fig. 3) et l'on obtient ainsi la valeur du taux de Bilirubine Totale.

4° TAUX DE BILIRUBINE CONJUGUÉE.

Ce taux est la différence entre le taux de Bilirubine Totale et le taux de Bilirubine Libre.

TROISIEME PARTIE

RESULTATS

Généralités.

Le présent travail porte sur l'examen de 64 échantillons de liquide amniotique prélevés soit au cours d'accouchements soit au cours de 57 ponctions transabdominales réalisées depuis septembre 1962 à la Clinique Obstétricale de Lyon.

L'analyse des liquides amniotiques a été effectuée ainsi qu'il est indiqué plus haut, cependant nous devons préciser que la méthode d'extraction par l'Alcool Amylique n'ayant été mise au point qu'au cours de notre expérimentation, les premiers taux de Bilirubine Totale étaient obtenus par dosage direct. Nous avons vu que cette méthode pouvait parfois être entachée d'erreur.

Il n'en est pas de même pour les taux de Bilirubine Libre, la méthode d'extraction benzénique ayant été appliquée dès le début de notre expérimentation.

Par ailleurs, nous avons exclu de notre étude la plupart des liquides amniotiques prélevés au moment de l'accouchement, et qui, comme nous l'avons dit plus haut, étaient souillés par des déchets divers. Nous n'avons gardé que ceux qui, après deux filtrations-centrifugations, étaient parfaitement limpides, quel que soit leur coloration. Cette qualité est en effet absolument indispensable pour l'étude spectrophotométrique.

De même, nous avons dû écarter 4 liquides amniotiques prélevés par ponction transabdominale au-delà de la 35^e semaine (voir première partie), dans lesquels persistait également un trouble après filtration-centrifugation.

La plupart de nos observations font donc état de ponctions amniotiques effectuées entre la 32^e et la 35^e semaine, et qui, dans 3 cas d'hydramnios très important, furent répétées 2 fois à intervalle d'environ 2 semaines, essentiellement dans un but thérapeutique. En tenant compte des ponctions blanches, il nous reste donc 46 échantillons, correspondant à 43 cas.

**

Nous avons classé nos observations de trois manières, en tenant compte :

1° *Des éléments classiques de pronostic, c'est-à-dire :*

— Groupes sanguins de la mère et du père, et homozygotisme (noté « H ») ou hétérozytisme (noté « h ») de ce dernier, chaque fois que cet élément nous était connu ;

— Antécédents obstétricaux de la mère, pour tenir compte de la loi de l'aggravation progressive de l'atteinte fœtale par la maladie hémolytique au fur et à mesure des grossesses, mais nous avons évidemment exclu toutes les affections indépendantes de la maladie hémolytique, notamment les avortements précoces ;

— Données sérologiques, et en particulier, notion d'augmentation du taux des agglutinines dans le sang maternel, entre le début et la fin de la grossesse en cause ;

— Evolution et éventuellement anomalies notées au cours de la grossesse (Hydramnios, etc...).

2° *Des données fournies par l'examen du liquide amniotique, c'est-à-dire :*

— Aspect macroscopique du liquide au moment du prélèvement, en particulier, souillures par du sang ou du méconium ;

— Taux de Biliburine Totale (noté « B. T. ») ;

— Taux de Bilirubine Conjuguée (noté « B. C. ») ;

— Taux de Bilirubine Libre (noté « B. L. ») ;

— Rapport entre la Bilirubine Libre et la Bilirubine conjuguée : B.L./B.C.

3° *De l'état et de l'évolution de l'enfant.*

Nous avons repris là une classification voisine de celle de Mayer (39). Pour cet auteur, il importe de tenir compte non pas d'un seul critère, mais de l'ensemble des faits.

En effet, l'état clinique de l'enfant, les signes viscéraux ou nerveux remarquables, par exemple l'existence d'un anasarque ou de troubles de la tonicité musculaire, témoignent certes de la maladie hémolytique, mais peuvent aussi résulter en partie de l'anoxie d'origine obstétricale, surtout si des difficultés ont été rencontrées dans le déclenchement de l'accouchement, ou du degré de prématurité de l'enfant. Quant à l'évolution des signes cliniques et biologiques, elle est évidemment directement influencée par la thérapeutique. Inversement, le fait que l'on ait dû pratiquer une ou deux exsanguinotransfusions ne peut non plus être considéré comme un critère suffisant car les indications d'exsanguinotransfusion sont tirées d'un ensemble de renseignements cliniques et biologiques que l'évolution aurait peut-être pu, parfois, contredire.

Le taux de Bilirubine sanguine est rarement très élevé à la naissance, mais son élévation brusque dans les heures qui suivent celle-ci peut être une indication sur le degré

d'atteinte. Il ne reflète cependant que fort mal l'état de la Bilirubine tissulaire et les possibilités de la glycurono-conjugaison qui dépendent du degré de maturité enzymatique du fœtus.

Le critère d'hémolyse le plus sûr paraît être l'abaissement du taux d'Hémoglobine, du nombre des globules rouges, et de l'hématocrite ; cependant interviennent là aussi les phénomènes d'œdème et de dilution sanguine.

RESULTATS

Tenant compte de ces divers facteurs, nous avons classé nos observations en 5 groupes :

1° ENFANTS NON ATTEINTS.

Il y a lieu de séparer ici :

Catégorie 1 A : Enfants chez qui aucune maladie hémolytique ne pouvait exister, soit par suite de la compatibilité des sangs maternel et paternel, soit parce que la mère était RH+ (3 cas).

Dans 2 cas la Bilirubine Libre est inférieure à 0,50 mg pour 1000 alors que dans le 3^e cas elle est très supérieure. Mais en reprenant cette observation, nous nous sommes néanmoins aperçu qu'il s'agissait d'un liquide très chargé de sang, et le dosage ayant été effectué par examen direct et non après extraction par l'Alcool Amylique, il est possible qu'il ait été perturbé par ce facteur.

Il reste que dans ces 3 cas, le rapport B.L./B.C. est voisin de 0,5.

Catégorie 1 B : Enfants chez qui la maladie hémolytique pouvait cependant être envisagé (mère RH — et père RH+) mais qui ne furent pas atteints car, le père étant hétérozygote, l'enfant était RH—.

Nous ne pouvons malheureusement en présenter qu'un cas, mais il est particulièrement intéressant dans la mesure où, par suite des antécédents obstétricaux et du taux des agglutinines dans le sang maternel, on pouvait émettre un pronostic défavorable dans le cas où l'enfant était RH+. L'analyse du liquide amniotique permet de corriger

ce pronostic car le taux de Bilirubine Libre reste très faible, de même que le rapport B.L./B.C.

2° CATÉGORIE 2 : ATTEINTES LÉGÈRES.

Nés de mères immunisées à des degrés divers, ces enfants sont RH+, mais ne présentent pas de signes cliniques d'atteinte. Le test de Coombs est positif, la Bilirubinémie, peu élevée à la naissance, s'élèvera en général assez tardivement, et s'abaissera spontanément, sans que l'on ait eu à pratiquer une exsanguinotransfusion. L'Hémoglobine du sang cordonal est toujours supérieure à 14 pour 100 et l'anémie est inexistante ou modérée.

Dans 11 cas sur 12 la Bilirubine Totale est inférieure à 1,85 pour 1000 et dans tous les cas la Bilirubine Libre est inférieure à 0,80 pour 1000. Quant au rapport B.L./B.C., il montre dans 9 cas une nette prédominance de la Bilirubine Conjugée sur la Libre, dans un cas, l'égalité, et dans 2 cas, ce rapport est inversé par rapport à la moyenne.

ETAT DE L' ENFANT

PONCTIONS

ELEMENTS CLASSIQUES DU PRONOSTIC

GROUPE SANGUINS		N° grossesse	ANTECEDENTS OBSTETRICAUX		IMMUNISATION MATERNELLE		mg %		AMNIOTIQUES			Groupe	Test de Coombs	SANG CORDONAL		SIGNES CLINIQUES EVOLUTION
Mère	Fœtus		EVOLUTION DE LA GROSSESSE	Debut	Fin	B.T.	B.C.	B.L.	B.C.	B.L.	B.C.			Bilir.	Hémog.	
CATEGORIE 1A																
+		3	RAS					1,22	0,35	0,47	0,6					Enfant Sains
+		2	RAS					2,40	2,36	1,04	0,5					
+		3	RAS					1,22	0,81	0,41	0,5					
CATEGORIE 1B																
-	+ h	6	5 ^e enf. : Ictère Sévère	1/64	1/64			1,52	1,42	0,10	0,1	-	-	2,2	15	Enfant Sain
CATEGORIE 2																
-	+ H	4	3 ^e enf. : Mort - né	1/32	1/32			0,85	0,65	0,20	0,3	+	+	2	17	Pas de Signes Cliniques Evolution Spontanément Bonne
-		2	RAS	1/2	1/4			1,00	0,36	0,64	1,7	+	++	2,1	14,8	
-		4	RAS	1/4	1/8			1,42	1,13	0,29	0,3	+	++	2	14,3	
-	+ h	3	2 ^e enf. : Ictère sévère	1/64	1/64			1,85	1,15	0,70	0,6	+	+++	2,4	16,2	
-	+ h	4	2 ^e enf. : Ictère léger	1/2	1/16			1,28	1,11	0,17	0,2	+	+	2,1	16	
-	+ H	2	RAS	0	1/32			1,29	1,02	0,29	0,3	+	+++	1,8	14,8	
-	+	2	RAS	1/32	1/32			3,10	1,73	0,17	0,1	+	+	3,2	20,8	
-	+ H	4	2 ^e enf. : Ict nucléaire Mortel 3 ^e enf. : Ictère Sévère	1/4	1/4			1,32	0,68	0,64	1,0	+	++	3,2	15,3	
-		3	2 ^e enf. : Ictère léger	1/8	1/8			1,10	0,48	0,62	1,3	+	++	2,7	15,8	
-	+ h	5	3 ^e enf. : Ictère léger	1/8	1/16			1,35	1,38	0,47	0,3	+	++	2,4	14,7	
-		2	RAS	1/4	1/16			1,24	0,69	0,55	0,8	+	+++	3,4	14,9	Pas de Signes Cliniques Evolution Spontanément Bonne
-	+ h	4	RAS	1/4	1/8			1,72	0,90	0,82	0,9	+	++	2,8	16,1	

TABLEAU I

3° CATÉGORIE 3 : ATTEINTES MOYENNES.

Il s'agit d'enfants ayant présenté des signes cliniques plus ou moins nets, avec une Bilirubinémie parfois relativement élevée dès la naissance, ou s'élevant rapidement, et un taux d'hémoglobine dans le sang cordonal compris entre 11 et 14 g pour 100. L'ensemble de ces faits a motivé la pratique d'une exsanguinotransfusion, mais dans tous les cas l'évolution a été favorable sans qu'il ait été besoin de renouveler cette intervention.

Dans cette catégorie, les taux de Bilirubine Totale dans le liquide amniotique sont tous supérieurs à 1 mg pour 1000 mais paraissent répartis de façon très irrégulière. De même dans 7 cas nous apercevons une nette prédominance de la Bilirubine Conjuguée sur la Libre alors que dans les 7 autres cas, le rapport est inverse.

Par contre, les valeurs de la Bilirubine Libre sont groupées dans un intervalle beaucoup plus restreint.

4° CATÉGORIE 4 : ATTEINTES SÉVÈRES.

Ces enfants ont présenté des signes cliniques nets : ictère, hépatosplénomégalie, voire signes neurologiques. L'anémie est importante. La Bilirubinémie est élevée et l'Hémoglobine cordonale est abaissée en-dessous de 11 g pour 100. Cet état de l'enfant et l'évolution défavorable obligent à pratiquer deux exsanguinotransfusions successives.

Dans tous les cas la Bilirubine Totale est supérieure à 1,90 mg pour 1000 et la Bilirubine Libre à 1,50 mg pour 1000. De même dans tous les cas il y a une nette prédominance de la Bilirubine Libre sur la Conjuguée, avec un rapport B.L./B.C. toujours supérieur à 2.

Dans 2 cas où l'examen a été répété, nous assistons à une augmentation des taux de la Bilirubine Totale et de la Libre, alors que le rapport B.L./B.C. reste stationnaire, ou augmente.

ELEMENTS CLASSIQUES DU PRONOSTIC				PONCTIONS				STAT DE L'ENFANT						
GROUPE SANGUIN		Nécessité	ANTÉCÉDENTS OBSTÉTRICAUX EVOLUTION DE LA GROSSESSE	IMMUNISATION MATERNELLE		Mg %	AMNIOTIQUES			Groupe	Sérum IgG IgM IgA	SANG CORDONAL		SIGNES CLINIQUES EVOLUTION
Mère	Père			DEBUT	FIN		B.T.	B.C.	B.L.			B.L. B.C.	Bilir.	
CATEGORIE 3														
-	-	9	8 ^e enf. = Ictère nucléaire *	1/8		2,75	0,90	1,85	2	+	+++	2,5	11	Ictère Précoce 1 E.S.T. Bonne Evolution
-	+h	3	RAS	0	1/32	3,10	2,50	0,60	0,2	+	++	5,1	14,5	Bonne Evolution
-	-	9	1 ^{re} enf. : Ictère Sévère 8 ^e enf. : Mort - né Hydramnios	1/128		1,42	0,29	1,13	3,9	+	+++	6,9	11,8	Ictère + Hépatosplénomég. 1 E.S.T. Bonne Evolution
-	-	2	RAS	0	1/8	1,95	1,60	0,35	0,2	+	++	1,7	12	1 E.S.T. Bonne Evolution
-	+H	1	Transfusion en 1957	1/64	1/256	5,22	3,78	1,22	0,3	+	+++	4,5	13,2	
-	+h	6	4 ^e enf. : Ictère Mortel *	1/32		2,40	0,58	1,82	3	+	+++	3,6	14	Ict. Léger : 1 E.S.T. Bonne Evolution
-	+h	9	1 ^{re} et 8 ^e enf. : Ictère	1/256	1/256	2,90	1,07	0,83	0,8	+	+	2,6	13,5	1 E.S.T. Bonne Evolution
-	-	3	4 ^e enf. = Anasarque	1/16	1/128	3,50	2,15	1,35	0,6	+	+++	6,6	9,7	
-	+h	2	RAS	1/32	1/64	3,20	2,02	1,18	0,6	+	+++	5,0	10,8	Ictère Précoce 1 E.S.T. Bonne Evolution
-	+h	4	RAS	1/16	1/256	1,84	0,30	1,54	5	+	+	5,1	10,8	
-	-	4	2 ^e enf. = Mort - né Léger Hydramnios	1/16	1/16	2,95	2,19	0,76	0,3	+	+++	2,2	12,8	
-	+h	5	8 ^e enf. = Ictère. Hydramnios Important (2 ponctions)	1/8	1/32	1,43	0,49	0,94	2	+	+++	3,4	11,6	1 E.S.T. Bonne Evolution
-	+H	2	RAS	1/32	1/64	1,14	0,23	0,89	3,5	+	+++	4,8	11,5	

TABLEAU II

5° ENFANTS MORTS IN UTERO.

Il y a lieu de distinguer 2 sous-groupes :

Catégorie 5 A : Enfants morts in utero du fait d'une maladie hémolytique particulièrement sévère. Nous en présentons 4 cas, mais nous ne donnons ces résultats qu'avec beaucoup de réserves car il s'agit toujours de ponctions qui furent effectuées *après* l'apparition de signes cliniques et parfois radiologiques d'arrêt de la grossesse, donc, un certain temps après la mort du fœtus in utero. Ces liquides amniotiques étaient toujours très souillés et le trouble persistant après filtration-centrifugation a sans doute faussé les mesures. L'aspect macroscopique de ces liquides aurait suffi à faire porter un pronostic très défavorable.

Le dernier cas est intéressant dans la mesure où il correspond à une primigeste dont le taux d'agglutinines était très élevé. On n'a pas pu préciser s'il y avait eu une transfusion sanguine dans les antécédents et de plus, on ne sait quelle importance il convient d'attribuer à l'existence simultanée d'une néphropathie gravidique.

Catégorie 5 B :

Enfants morts in utero par suite d'une autre cause que la maladie hémolytique. Il est remarquable que, bien que les 2 premiers liquides aient été prélevés exactement dans les mêmes conditions que ceux de la série précédente, ils soient restés très clairs.

Pour ces 3 cas, les résultats restent faibles, voisins de ceux que nous avons observés pour la série des enfants ne présentant qu'une atteinte légère.

ELEMENTS CLASSIQUES DU PRONOSTIC					PONCTIONS			AMNIOTIQUES			ETAT DE L'ENFANT			SIGNES CLINIQUES EVOLUTION		
GROUPE SANGUIN		N° grossesse	ANTECEDENTS MATERIELS EVOLUTION DE LA GROSSESSE		IMMUNISATION MATERIELLE		mg%		B.L.		B.C.	Groupes	Test +/-		SANG CORDONAL	
Mère	Fœtus		Début	Fin	B.I.	B.C.	B.L.	B.C.	Bilirub	Hemog.						
CATEGORIE 4.																
-		4	RAS	1/16	1/32	2,50	0,16	1,74	2,14		+	+++	6,3	3,9	Mort apparente - 2 E.S.T.	
-		5	RAS		1/16	2,43	0,17	1,76	2,7		+	+++	9,2	13	Ictère intense. 2 E.S.T.	
-	+ H	3	RAS	1/16	1/32	1,93	0,35	1,58	4,5		+	+++	4,3	8,2	id.	
-		5	2 ^e enf : Mort. - les Hydramnios important (2 ponctions)	1/32	1/64	2,41	0,30	1,71	2,14		+	+++	4,2	8,4	Ict. + légère hypotonie 2 E.S.T.	
-	+ H	8	4 enfants atteints		1/8	3,35	1,02	2,53	2,2		+	++	5	13	Ict. Préco 1 E.S.T.	
-	+ H	2	RAS	1/32	1/64	2,87	0,63	2,24	3,5		+	+++	4,6	10,5	id.	
-	+ H	3	2 ^e enf : Ict. nucléaire. Hydramnios important (2 ponctions)		1/32	3,27	1,03	2,24	2,2		+	+++	5,3	9,8	Ict. Intense 2 E.S.T.	
CATEGORIE 5 A																
-		6	RAS		1/128	9,20	0,30	2,90	2,9						Macéré	
-		6	1 ^e enf : Ictère 5 ^e enf : Anasarque	1/128	1/128	20,40		20,60							Macéré (Anasarque)	
-	+ H	2	2 ^e enf : Ictère Hydramnios	0	1/8	8,10		9,20							id.	
-	+ H	1	Néphropathie + Hydramnios		1/128	6,80	1,00	5,80	6						Anasarque	
CATEGORIE 5 B																
+		2	RAS		0	3,10	2,56	0,74	0,2						Mort. né	
+		1	Hydramnios		0	2,90	1,29	1,71	1,1						Monstre bi-céphale	
+		2	Néphropathie + Hydramnios		0	1,30	0,69	0,61	0,9						Anasarque + Mort Apparente Echec de réanimation	

TABLEAU III

DISCUSSION

Nous donnons (fig. 4) une récapitulation de l'ensemble de ces résultats.

Sur le schéma correspondant à la Bilirubine Totale, on voit se détacher assez nettement une limite pour une valeur de 2 mg pour 1000. Nous trouvons en-dessous tous les cas d'atteinte légère sauf un et au-dessus tous les cas d'atteinte sévère sauf un, d'ailleurs assez proche de la limite. Cependant, les atteintes moyennes sont réparties de façon assez irrégulière. De même, si les 4 cas d'enfants morts in utero du fait d'une maladie hémolytique sont placés très en haut du schéma (et même certains d'entre eux devraient se trouver en dehors de ses limites), les cas d'enfants morts in utero par suite d'une autre cause et d'enfants sains sont répartis de façon très inégale.

Les mêmes remarques sont valables pour le rapport B.L./B.C. : dans les atteintes sévères il y a toujours une nette prédominance de la Bilirubine Libre sur la Conjugée (Rapport supérieur à 2), alors que dans les cas d'atteinte légère, sauf 2 cas, d'enfants sains et d'enfants morts in utero par suite d'une autre cause que la maladie hémolytique, on constate au contraire une prédominance plus ou moins nette de la Bilirubine Conjugée sur la Libre (Rapport inférieur à 1). Cependant on constate que les cas d'atteinte moyenne sont répartis de façon très irrégulière.

FIG. 4

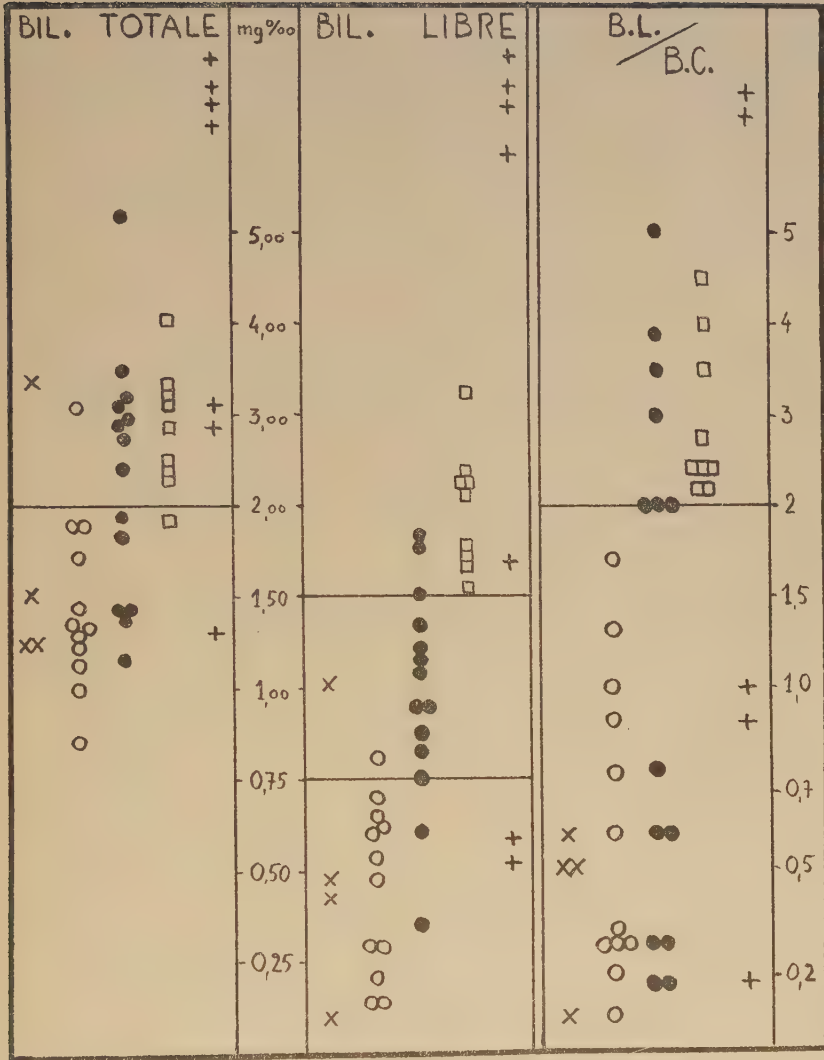


Fig. 4

X ENFANTS SAINS
 O ATTEINTES LÉGÈRES
 ● " MOYENNES
 □ " SÉVÈRES
 + ENFANTS MORTS

Sur le schéma de la Bilirubine Libre, on voit se dessiner très nettement 4 zones :

— Une zone de valeurs inférieures à 0,75 mg pour 1000 où nous trouvons :

— 3 sur 4 des cas d'enfants sains ;

— 2 sur 3 des cas d'enfants morts in utero par suite d'une autre cause que la maladie hémolytique ;

— Pratiquement tous les cas d'atteintes légères ;

— 2 cas d'atteintes moyennes. En reprenant ces cas (qui ont été marqués d'un * sur le tableau II), on constate que le second (Bilirubine Libre = 0,35 mg pour 1000), correspond à une immunisation relativement légère. Il n'en est sans doute pas de même pour l'autre cas, où l'on note un ictère précoce et une Bilirubinémie cordonale relativement élevée.

En somme cette zone semble correspondre presque toujours à des cas où l'expectative était permise.

— Une zone de valeurs comprises entre 0,75 et 1,50 mg pour 1000 où l'on ne rencontre pratiquement que des cas d'atteintes moyennes, et la grande majorité de celles-ci, soit des cas justiciables d'un accouchement prématuré provoqué tardif.

— Une zone de valeurs supérieures à 1,50 mg pour 1000 où l'on trouve :

— Tous les cas d'atteintes sévères ;

— deux cas d'atteintes moyennes (marqués de ** au tableau II) ;

— un cas d'enfant mort in utero pour une autre cause que la maladie hémolytique.

Il s'agit donc presque toujours de cas justiciables d'un accouchement prématuré provoqué plus précocement.

— Enfin une zone de valeurs extrêmement élevées, dans laquelle se trouvent les cas d'enfants morts in utero du fait de la maladie hémolytique.

On voit donc que la recherche du taux de Bilirubine Libre dans le liquide amniotique est un examen assez significatif du degré de l'atteinte fœtale, et qui peut aider considérablement à l'établissement du pronostic, permettant en particulier de décider dans de meilleures conditions l'indication de l'accouchement prématuré provoqué et la date à laquelle cette intervention peut être utile.



Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'explication à cette présence de la Bilirubine dans le liquide amniotique. Wild (53) démontre seulement qu'elle est d'origine fœtale.

Comment expliquer que l'on ne remarque, en consultant les tableaux I, II, et III, aucun parallélisme certain entre les taux de Bilirubine trouvés dans le liquide amniotique et les taux de la Bilirubinémie au moment de la naissance, même quand l'examen du liquide amniotique est très tardif ?

Comment expliquer également la présence et parfois la prédominance de la Bilirubine Libre dans le liquide amniotique ? Le taux de la Bilirubine Libre dépend de plusieurs facteurs :

— La surproduction de Bilirubine Libre du fait de l'hémolyse ;

— La carence plus ou moins complète du foie fœtal en glucuronyltransférase ;

— Le rôle épurateur du placenta (Mayer, 39).

Mais la Bilirubine Libre n'est en principe pas éliminée par le rein, du fait peut-être de son insolubilité résultant de l'absence de conjugaison (d'où découle également sa toxicité).

En fait, le liquide amniotique n'est ni du sang, ni de l'urine. Sa teneur en protéines est bien supérieure à celle

de l'urine mais on y trouve des substances qui sont nettement de type urinaire, en particulier des déchets hormonaux.

Bien que ces problèmes ne soient pas résolus, il reste que l'examen du liquide amniotique présente un grand intérêt dans tous les cas où le pronostic fœtal est difficile à établir par les moyens classiques, et qu'il peut même parfois permettre de corriger certaines erreurs auxquelles on aurait été entraîné par les données sérologiques.

CONCLUSIONS

1° Les éléments anamnestiques, cliniques et sérologiques n'ayant pas une valeur absolue pour l'établissement du pronostic fœtal dans les grossesses avec immunisation anti-RH, certains auteurs ont étudié la valeur de l'analyse du liquide amniotique prélevé par ponction transabdominale pendant la période anténatale, et conclu au très grand intérêt de la mise en évidence de Bilirubine dans ce liquide.

2° Ces études étant restées uniquement qualitatives, nous proposons une méthode quantitative : dosage spectrophotométrique de la Bilirubine extraite du liquide amniotique par des solvants organiques, Benzène et Alcool Amylique. Cette méthode est de réalisation très simple et très rapide, et elle permet de plus le dosage séparé de la Bilirubine Libre, même en présence d'hémoglobine.

3° La confrontation des faits cliniques avec les résultats de nos dosages montre, dans la très grande majorité des cas, une concordance entre le degré de l'atteinte fœtale par la maladie hémolytique, et le taux de Bilirubine Libre dans le liquide amniotique. Ce moyen de recherche aide donc beaucoup à l'établissement du pronostic fœtal, permettant en particulier de décider dans de meilleures conditions la date où il peut être utile de provoquer l'accouchement.

Nos observations paraissent démontrer l'intérêt de la pratique de la ponction amniotique dans les cas où le pronostic fœtal est particulièrement difficile à établir par les moyens classiques.

Vu :

Le Doyen,

J.-F. CIER

Vu :

Le Président de la Thèse,

H. PIGEAUD.

Vu et permis d'imprimer : Lyon, le 1^{er} Juin 1964

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,

P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

1. BARAC (G.). — Standardisation et dosage de la Bilirubinémie plasmatique totale. *Acta Clin. Belg.*, 12, 307 (1957).
2. BAUX (R.), FERRIER (Y.), DUCOS (J.), BIERME (R.) et COMBEL (R.). — Groupage fœtal par ponction amniotique. *Rev. Franç. Gynéc.*, 10, 4, 459 (1958).
3. BAUX (R.), FERRIER (Y.), DUCOS (J.), BIERME (R.) et COMBEL (R.). — Anasarque fœtoplacentaire par iso-immunisation au facteur RH. Diagnostic par amniographie et détermination du groupe sanguin fœtal avant la naissance. *Gynéc. et Obstét.*, 10, 1, 100 (1958).
4. BEECHAM (C.-T.), MOLTHAM (L.), BOUTWELL (J.) et ROHRBECK (C.-W.). — Amniotic fluid studies in RH sensitized Women. A preliminary report. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 83, 2, 1053 (1962).
5. BENARD (H.), GADJOS (A.) et TISSIER (A.). — Hémoglobine et pigments apparentés. 1^{er} vol., Masson, édit, Paris (1949).
6. BENHAMOU (J.-P.) et BESSON (R.). — Le dosage de la Bilirubine benzéno-extractible du sérum. Technique et résultats. *Path. et Biol.*, 7, 111 (1959).
7. BESSON (R.) et FAUVERT (R.). — Dosage de la Bilirubine benzéno-extractible. *Rev. Franç. Et. Clin. Biol.*, 3, 673 (1958).
8. BEVIS (D.-C.-A.). — The antenatal prediction of haemolytic disease of the newborn. *Lancet*, 1, 395 (1952).
9. BEVIS (D.-C.-A.). — The composition of liquor amnii in haemolytic disease of the newborn. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp.*, 60, 244 (1953).
10. BEVIS (D.-C.-A.). — Blood pigments in haemolytic disease of the newborn. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp.*, 68 (1956).
11. BERGH (Van den) (H.) et SNAPPER (I.). — Die Farbstoffe des Blutserums. *Deutsch. Arch. Klin. Med.*, 110, 540 (1913).
12. BERGH (Van den) (H.) et MULLER (P.). — Uber eine direkte und indirekte Diazoreaktion auf Bilirubin. *Biochem. Z.*, 77 (1916).
13. BILLING (B.-H.), COLE (P.-G.) et LATHE (G.-H.). — The excretion of Bilirubin as a Diglycuronid giving the direct Van den Bergh reaction. *Biochem. J.*, 65, 774 (1957).

14. BILLING (B.-H.). — Bile pigments in jaundice. *Adv. in Clin. Chem.*, 2, 267 (1959).
15. BRUKNER (J.). — A study on the estimation of low concentration of serum Bilirubin. *Am. J. Clin. Pathol.*, 32, 513 (1959).
16. CARY (W.). — Amniocentesis in haemolytic disease of the newborn. *Med. J. Austr.*, 47 (2), 778 (1960).
17. CHABROL (E.), BOSZORMENYI (M. et FALLOT (P.). — Les oxydo-réductions de la Bilirubine. *Sem. Hôp.*, 25, 3437 (1949).
18. CHILDERS (D.-M.) et BARGER (J.-D.). — Determination of heme pigments in plasma. *Am. J. Clin. Pathol.*, 29, 546 (1958).
19. DELCOURT (R.). — La valeur de la mesure spectrophotométrique de la Bilirubine par la technique de Shinowara. *Acta Clin. Belg.*, 13, 308 (1958).
20. DEMANGE (G.), BALLAN (P.), MORETTI (G.-F.) et STAEFFEN (J.). — A propos du dosage des Bilirubinémies. Durable valeur de la technique originale de Malloy et Evelyn avec lecture de la Bilirubine directe 30 minutes après addition de Diazoréactif. *Ann. Biol. Clin.*, 17, 588 (1959).
21. DIQUE (J.-C.-A.) et WRENCH (D.). — Erythroblastosis foetalis. A survey of three hundred and twenty eight cases. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp.*, 66 (2), 251 (1959).
22. DUCCI (H.) et WATSON (C.-J.). — The quantitative determination of the serum Bilirubin with special reference to the prompt reacting and chloroforme soluble types. *J. Lab. and Clin. Med.*, 30, 293 (1945).
23. FAUVERT (R.) et BENHAMOU (J.-P.). — Les ictères à Bilirubine libre. *Rev. du Prat.*, 10, 831 (1960).
24. FIESSINGER (N.) et WALTER (H.). — La bilirubimétrie plasmatique ; Son but ; Sa technique ; Ses enseignements. *Nutrition*, 1, 225 (1931).
25. FOG (J.). — Determination of Bilirubin in serum as alkaline azobilirubin. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 10, 241 (1958).
26. FREISLEBEN (F.). — Erythroblastose foétale. *Thèse* (1956).
27. GOPLERUD (C.-P.). — Perinatal mortality in erythroblastosis foetalis. *Obstet. and Gynec.*, 17, 355 (1961).
28. HEILMEYER (L.). — Spectrophotometry in medicine. *Hilger*, London (1943).

29. HSIA (D.-Y.-Y.), HSIA (H.-H.), GOFSTEIN (R.-M.), WINTER (A.) et GELLIS (S.-S.). — Determination of concentration of Bilirubin in serum. *Pediatrics U.S.A.*, 18, 433 (1956).
30. JENDRASSIK et GROF (P.). — Vereinfachte photometrische Methode zur Bestimmung des Bluthilirubins. *Biochem. Z.*, 8, 297 (1938).
31. JOUVENCEAUX (A.) et REVOL. — A propos du traitement et de la surveillance de la maladie hémolytique du nouveau-né. Micro- et macro-dosages de la Bilirubine. *Presse Méd.*, 65, 1440 (1957).
32. KLASKIN (G.) et DRILL (V.-A.). — The significance of the one minute (Prompt direct reacting) Bilirubin in serum. *J. of Clin. Invest.*, 29, 660 (1950).
33. KRIEGER. — Les tests sérologiques chez les mères iso-immunisées. *Aust. N.-Z. J. Obstet. Gynaec.*, 1, 40 (1961).
34. LILEY (A.-W.). — The technique and complications of amniocentesis. *N.-Z. Med. J.*, 59, 581 (1960).
LILEY (A.-W.). — Liquor amnii analysis in the management of the pregnancy complicated by rhesus sensitization. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 82, 1359 (1961).
35. MACBETH (R.-D.) et ROBERTSON (S.-B.). — Management of Rhesus incompatible pregnancies employing amniocentesis and spectroscopic examination of liquor amnii. *Med. J. of Austr.*, 48 (2), 573 (1961).
36. MACKAY (E.-V.). — The management of isoimmunized pregnant women with particular references to amniocentesis. *Austr. N.-Z. J. Obstet. Gynaec.*, 1, 78 (1961).
37. MALLOY (H.) et EVELYN (K.-A.). — The determination of Bilirubin with photoelectric photometer. *J. Biol. Chem.*, 119, 481 (1937).
38. MAYER (M.), GUERITAT (P.), DUCAS (P.) et LEWI (S.). — L'examen du liquide amniotique, élément essentiel du pronostic anténatal de l'érythroblastose fœtale. *Presse Méd.*, 69, 2493 (1961).
39. MAYER (M.), DUCAS (P.) et LEWI (S.). — L'étude de la Bilirubine amniotique dans le pronostic et le traitement de l'érythroblastose fœtale par iso-immunisation anti-RH. *Gynéc. Obstét.*, 62, 4, 461 (1963).
40. MATHIEU-DAUDE (P.). — Spectrophotométrie de la Bilirubine. Application à l'étude de la maladie hémolytique du nouveau-né. *Montpellier Méd.*, 2 (Supp.) (1963).

41. MERTZ (J.-E.) et WEST (C.-D.). — A rapid micromethod for the determination of indirect Bilirubin. *J. Dis. Child. U.S.A.*, 91, 19 (1956).
42. MEILENGRACHT. — Die Klinische Bedeutung der Untersuchung auf Gallenfarbstoff im Blutserum. *Deutsch. Arch. Klin. Med.*, 132, 285 (1920).
43. MONCRIEFF (A.), STABLER (F.) et NORMAN (A.-P.). — Haemolytic disease of the newborn. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp.*, 67, 740 (1960).
44. MONNET (L.). — Contribution à l'étude du dosage des pigments biliaires du sérum sanguin (Bilirubine totale et fraction non conjuguée). *Thèse*, Lyon (1961).
45. MONNET (L.). — Sur les méthodes de dosage de la Bilirubine du sérum (Bilirubine totale, conjuguée et non conjuguée). *Ann. Biol. Clin.*, 21, 10, 717 (1963).
46. PIGEAUD (H.) et GABRIEL (H.). — L'interruption prématurée thérapeutique de la gestation en cas d'iso-immunisation anti-RH. *Gynéc. Obstét.*, 34, 2, 202 (1955).
47. RIVOIRE (R.). — Bilirubine Directe et Bilirubine Indirecte. Quelques faits nouveaux. *Ann. Méd.*, 47, 147 (1946).
48. SEELEN (J.-C.). — Transabdominal amniotic puncture. Amniotic concentration of Bilirubin. *Med. T. Verlosk*, 61, 5 (1961).
49. TOVEY (G.-H.) et VALAES. — Prevention of stillbirth in RH haemolytic disease. *Lancet*, 2, 521 (1959).
50. TOWNSEND (L.). — L'induction du travail chez les patientes iso-immunisées au facteur RH. *Austr. N.-Z. J. Obstet. Gynaec.*, 1, 27 (1961).
51. VARELA-FUENTES (B.) et RECARTE (D.). — Nouvelle technique simplifiée pour le dosage séparé des deux Bilirubines, Directe et Indirecte, des sérums ictériques. *C. R. Soc. Biol. Paris*, 116, 1193 (1934).
52. WALKER (A.-C.-H.). — Liquor amnii studies in the prediction of haemolytic diseases of the newborn. *Brit. Med. J.*, 2, 376 (1957).
53. WILD (A.-E.). — The association between protein and Bilirubin in liquor amnii. *Clin. Sci.*, 21, 221 (1961).
54. WITH (T.-K.). — Les Bilirubines Directes et Indirectes. Données récentes sur leur biochimie et leur signification clinique. *Ann. Biol. Clin.*, 16, 13 (1958).

TABLE DES MATIERES

PREMIÈRE PARTIE. — L'étude du liquide amniotique prélevé par transabdominale en vue d'établir le pronostic de l'atteinte fœtale dans les grossesses avec iso-immunisation anti-RH.	11
Problèmes du Pronostic de l'atteinte fœtale	11
1) L'accouchement prématuré provoqué, Intérêt, Réserves	11
2) Eléments classiques de Pronostic	13
La ponction amniotique	16
1) Technique de Prélèvement	16
2) Dangers de la Ponction	18
3) Indications et calendrier des Ponctions	19
L'étude du liquide amniotique	22
1) Historique	22
2) Etude spectrophotométrique du liquide amniotique	23
3) Essais de dosage	27
DEUXIÈME PARTIE. — Dosage de la Bilirubine dans le Liquide amniotique	29
Historique	29
1) Notion de Bilirubine Libre et Conjuguée	29
2) Méthodes de dosage	30

Dosage spectrophotométrique direct	33
1) Etalonnage de l'appareil	33
2) Application au liquide amniotique	36
3) Critique	40
Extraction par les solvants organiques	42
a) Extraction par le Benzène	43
b) Extraction par l'Alcool Amylique	44
Méthode générale de dosage	47
 TROISIÈME PARTIE. — Résultats	 51
Généralités	51
Résultats	55
Discussion	62
 Conclusion	 67
 Bibliographie	 69

